

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 1 月 2 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 3 7 2 1 2
Application Number:

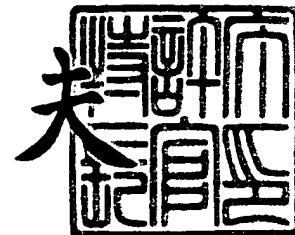
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 3 7 2 1 2]

願 人 独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構
Applicant(s):

2 0 0 4 年 3 月 2 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 2 5 9 0 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02447-YS

【提出日】 平成14年11月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/195

【発明の名称】 回転モーター分子 V 1 - A T P a s e

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区柿の木台 3 2 - 1 3
コーポカワハラ 2 0 3

【氏名】 今村 博臣

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市片瀬海岸
9 - 1 3 - 1 1 0 3

【氏名】 吉田 賢右

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市本町 1 1 6 5 - 2 B

【氏名】 横山 謙

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 回転モーター分子V₁-ATPase

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 V₀V₁-ATPaseのV₁部分を構成するAサブユニット 3 個、Bサブユニット 3 個、Dサブユニット 1 個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 2】 耐熱性を有する請求項 1 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 3】 好熱菌*Thermus thermophilus*由来である請求項 2 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 4】 Aサブユニットに相当する配列番号 3 のポリペプチド 3 個、Bサブユニットに相当する配列番号 4 のポリペプチド 3 個、Dサブユニットに相当する配列番号 5 のポリペプチド 1 個を有する複合体である請求項 3 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 5】 配列番号 3 における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方を有する請求項 4 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 6】 AサブユニットおよびBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている請求項 1 から 5 のいずれかの回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 7】 AサブユニットのN端に結合したHisタグを介して基板上に固定されている請求項 6 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 8】 Dサブユニットにジョイント部材が結合している請求項 1 から 7 のいずれかの回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 9】 配列番号 5 における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方のCys残基にジョイント部材を結合している請求項 8 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 10】 AサブユニットおよびBサブユニットにおける全てのCys残基が非Cys残基に置換されている請求項 9 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、マイクロマシンやナノマシンの駆動部（ナノアクチュエータ）等として有用な新規回転モーター分子V₁-ATPaseに関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

分子サイズの大きさで機械的な動きをするマイクロマシンやナノマシンの開発が注目されている。このようなマイクロマシンやナノマシンは、例えば、分子コンピュータの配線を加工する分子ロボットや体内で治療作業を行う医療用ロボットとして有望視されているからである。

【0003】

マイクロマシンやナノマシンを作成するためには、個々の要素デバイス（センサ、アクチュエータ、ミニチュア機械）や、それらの組立方法（マイクロマシニングやナノマシニング）に至るまで、様々な技術開発が必要とされている。特に、マイクロマシン駆動部であるマイクロアクチュエータやナノアクチュエータ（回転モーター）の開発は、マシンの自律運動にとって不可欠であり、様々な微細加工技術を利用したモーターデバイスの開発が進められている。しかしながら微細加工技術を応用した方法で作成できるマイクロアクチュエータは、小さいものでも100 μ m程度であり、マイクロマシンやナノマシンに装備するには、モーター装置の更なる微少化が求められている。

【0004】

そこで、微細加工技術によってモーターを構築するのではなく、回転運動能を有する単一分子をモーターとして利用することが提案されている。

【0005】

一般に、モーターとして利用できる分子は、外部エネルギーを回転運動に変換する動力機構があること、および1方向の回転を実現できることの2点を満たすことが求められている。そして、このような条件を満たす低分子有機化合物としては、例えば(3R,3'R)-(P,P)-trans-1,1',2,2',3,3',4,4'-octahydro-3,3'-dime-thyl-4,4'-bipheanthrydiene（非特許文献1）とTriptycyl(4)helicene（非特許文献2）が知られている。前者は、炭素-炭素二重結合を挟んで左右対称的な形

を持っているが、立体的な込み合いのためねじれた構造となっている。これに適当な熱や光を加えると4つのプロセスを経て1方向に回転させることができる。また2回の光反応と熱異性化反応で1サイクルを完了し、1方向のみに進行する。すなわち、この有機化合物は、熱異性化反応と光反応とによって回転運動を行う。光反応による回転は非常に速い（ピコセカンドのレベル）が、熱異性化反応による回転には数分以上かかるため、実用化に適していない。また、駆動力が極めて弱いという問題点を有している。一方、後者はフォスゲン付加反応とウレタン結合形成、開裂という化学反応を利用して分子の一方向の回転を示す。しかしながら、この分子は繰り返し回転ができないという、アクチュエータとしての致命的な欠陥を有している。

【0006】

一方、マイクロマシンやナノマシン等に利用可能な単一分子モーターとしては、鞭毛モーター（非特許文献3、4）、ATP合成酵素（非特許文献5）、ミオシンモーター（非特許文献6、7）、微少管系モーター（非特許文献8）、核酸合成酵素の運動タンパク質（非特許文献9）等の生体分子も知られている。

【0007】

このうち、ATP合成酵素は、真核生物のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核細胞膜などに普遍的に存在する膜タンパク質であり、細胞の消費するATPの大部分を合成している。ATP合成酵素（ F_0F_1 -ATP合成酵素）は分子量約50万にも及ぶ巨大膜タンパク質複合体であり、膜中に存在する F_0 部分と膜の外に存在する F_1 部分からなる。 F_0 部分は膜をプロトン（ H^+ ）が通過するために通り道になっており、 F_1 部分にはATPを合成/加水分解する触媒部位がある。 F_1 部分の分子量は約38万であり、例えばバクテリア由来のATP合成酵素における F_1 部分のサブユニット組成は $\alpha_3\beta_3\delta\gamma_1\epsilon_1$ である。 α と β サブユニットはどちらにも似たようなATP結合部位を有するが、触媒活性は β サブユニットにある。両者は交互に並んでリングを形成しており、この $\alpha_3\beta_3$ リングの中心部に γ サブユニットが存在している。 δ サブユニットは $\alpha_3\beta_3$ リングの頂上に結合し、ATP加水分解活性を制御している。 ϵ サブユニットは γ サブユニットに結合している。一方、 F_0 部分は分子量約10万であり、そのアミノ酸組成は、プロトンの移動に必須なグルタミ

ン酸およびアスパラギン酸を多く含んでいる。サブユニット組成は $a_1b_2c_9-12$ であり、cサブユニットは膜の中でリング状に配列し(cリング)、それにaサブユニットと、膜の外に長く突き出した腕を持つbサブユニット2個が結合している。従って、 F_0F_1 -ATP合成酵素は、 F_1 部分と F_0 部分とが、 γ ϵ -cリング、 δ -b₂の2箇所では結合している。さらに特筆すべきは、この F_0F_1 -ATP合成酵素分子が2種類のトルク発生装置を備えている点である。一つは F_1 部分に存在するATP駆動型装置であり、他方は F_0 部分に存在するプロトン駆動型装置である。すなわち、 F_0 部分がプロトンを細胞膜内に取り込む場合にはcリングが時計回りに回転し、プロトンを細胞膜外に排出する場合にはcリングは反時計回りに回転する。一方、 F_1 部分は、ATP合成時にはその γ サブユニットが F_0 側からみた場合に時計回りに回転し、ATP分解時には反時計回りに回転する。そして、このような2種類のトルク発生装置を備えることによって、ATP合成酵素が生み出すトルクは数十ピコニュートン・nmであり、分子モーターとしての十分な駆動力を有している。また水系で作動するため体内でのアクチュエータとして最適であり、アクチンを十分に動かす力があるために生体内の蛋白質、糖質、脂質、核酸を操作することも可能である。

【0008】

そしてこの出願の発明者らは、この F_0F_1 -ATP合成酵素分子を改良して、広範な回転速度の制御が可能な改変型 F_0F_1 -ATP合成酵素分子とその利用発明を既に発明し、特許出願している(特願2002-148232:出願日2002年5月22日)。また、最近になって、 F_1 -ATP合成酵素分子に亜鉛結合部位を導入し、亜鉛によって回転の開始・停止を制御することのできる回転モーター分子が報告されてもいる(非特許文献10)。

【0009】

【非特許文献1】

Nature 401:152-155, 1999

【非特許文献2】

Nature 401:150-152, 1999

【非特許文献3】

Microbiol. 6:1-18, 1967

【非特許文献 4】

Nature 245:380-382, 1973

【非特許文献 5】

Nature 386:299-302, 1997

【非特許文献 6】

Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:1057-1063, 1994

【非特許文献 7】

Curr. Opin. Cell Biol. 7: 89-93, 1995

【非特許文献 8】

Cell 42:39-50, 1985

【非特許文献 9】

Nature 409: 113-119, 2001

【非特許文献10】

Nature Materials 1:173-177, 2002

【0 0 1 0】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、様々な回転モーター分子がマイクロマシンやナノマシン等の駆動部材として提案されており、回転の形態や回転数、トルク、回転の制御方法等においてそれぞれに特徴を有している。従って、実際にマイクロマシンやナノマシンを作成するためには、その用途やマシン構成に応じて多くの候補分子から適切なものを選択する必要がある。しかしながら、これまでに報告されている回転モーター分子のそれぞれは、マイクロマシンやナノマシンの他種多様な用途や構成の全てに対応可能であるとは言い難い。そのため、マイクロマシンやナノマシン等の開発に当たっては、回転モーター分子のラインナップを一つでも多く充実させることが望まれている。

【0 0 1 1】

従って、この出願は、従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供することを課題としている。

【0012】

また出願は、その回転運動をさらに円滑なものにするために、さらには回転運動の伝達手段等を分子に付加するために改良された新規回転モーター分子を提供することを課題としてもいる。

【0013】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、 V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分を構成するAサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子 V_1 -ATPaseを提供する。

【0014】

この発明の V_1 -ATPaseは、触媒部位のAサブユニットを含み、AとBサブユニットは交互に配列し、 F_0F_1 -ATPaseの $\alpha_3\beta_3$ のように六量体の円筒を形成するものであって、Dサブユニットは A_3B_3 の円筒の中央の空洞を埋めており、Fサブユニットは、Dサブユニットに結合しており、DサブユニットとFサブユニットは、回転子（回転シャフト、回転軸）として働く。

【0015】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、耐熱性分子であることを一つの態様としており、その場合に好熱菌*Thermus thermophilus*由来の分子であることを好ましい態様としている。

【0016】

さらにこの好熱菌*Thermus thermophilus*由来の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、Aサブユニットに相当する配列番号3のポリペプチド3個、Bサブユニットに相当する配列番号4のポリペプチド3個、Dサブユニットに相当する配列番号5のポリペプチド1個を有する複合体であることを一つの好ましい態様としている。

【0017】

さらにこの発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、配列番号3における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方を有する改変型分子であることを別の態様としている。

【 0 0 1 8 】

この改変された V_1 -ATPaseは、触媒部位であるAサブユニットを改変することによりMgADP阻害が解消され、ATP加水分解活性が亢進する。すなわち野生型 V_1 -ATPaseはMgADP阻害によって回転が抑制される傾向にあるが、MgADP阻害が解消された変異型 V_1 -ATPaseは、効率よい回転運動を示す。

【 0 0 1 9 】

またさらに、この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、AサブユニットおよびBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子であることを別の態様としている。そしてこの場合には、AサブユニットのN端に結合したHisタグを介して基板上に固定されていることを好ましい態様としている。

【 0 0 2 0 】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseはまた、Dサブユニットにジョイント部材が結合していることを別の態様としている。そしてこの場合には、配列番号5における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方のCys残基にジョイント部材を結合していること、さらにはAサブユニットおよびBサブユニットにおける全てのCys残基が非Cys残基に置換されていることをそれぞれ好ましい態様としている。

【 0 0 2 1 】

すなわち、この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、細菌や真核生物のオルガネラ（液胞、リソソーム、ゴルジ体、細胞膜、被覆小胞、分泌顆粒等）に存在するV型（液胞膜型）ATPase（ V_0V_1 -ATPase）の、 V_1 部分（Aサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個からなる複合体）である。従来、 F_0F_1 -ATP合成酵素が回転モーター分子として機能することは知られていたが、この V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分（ V_1 -ATPase）が回転運動することは全く知られていなかった。この発明の V_1 -ATPaseは、Aサブユニット3個およびBサブユニット3個によって構成される「筒状体」の内側に位置するDサブユニットが回転シャフトとして機能することを初めて見出して完成されたものである。

【 0 0 2 2 】

なお、 V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分はDサブユニットにFサブユニット1個を結合して

いるが、この発明の V_1 -ATPaseはこのFサブユニットを結合した分子をも包含する。また、この発明の V_1 -ATPaseは野性型だけでなく、前記のと通りの各種変異体をも包含する。さらに、前記の非特許文献10に開示されているような亜鉛認識部位の導入変異体をも包含する。

【0023】

以下、発明の実施形態を示し、前記各発明について詳しく説明するが、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等の記載を参考にすることができる。

【0024】

【発明の実施の形態】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、各種細菌や真核生物が産生する V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分 (V_1 -ATPase) であり、この V_1 -ATPaseをコードするポリヌクレオチド (DNA断片、RNA断片。好ましくはcDNA断片。以下「 V_1 -ATPaseポリヌクレオチド」と記載することがある) を用いて遺伝子工学的に製造することができる。すなわち V_0V_1 -ATPaseをコードするポリヌクレオチド (cDNA断片) の配列は公知のデータベース (例えばGenBankデータベース: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等) において多数公開されており、これらの配列情報を利用したプローブハイブリダイゼーション法やPCR法によって既存のcDNAライブラリー等から容易に取得することができる。

【0025】

そして、この V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを公知の遺伝子工学的方法で発現させることによって、Aサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個からなる複合体 V_1 -ATPaseを取得することができる。例えば、例えば、RNAポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターに V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを組

換え、この組換えベクターをプロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、回転能を有するV₁-ATPaseをインビトロで生産することができる。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。また、V₁-ATPaseポリヌクレオチドを適当な宿主ベクター系において発現させれば、回転モーター分子V₁-ATPaseを大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞などで生産することができる。例えば、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクロニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターにポリヌクレオチドを組換えて発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、この形質転換体を培養すれば、その培養物から目的のV₁-ATPase分子を大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript I I、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。さらに、ポリヌクレオチドを真核細胞で発現させる場合には、ポリヌクレオチドをプロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作製し、このベクターをトランスフェクトした真核細胞から目的のV₁-ATPase分子を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞HEK293、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。形質転換細胞で発現させたV₁-ATPaseを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせることができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、

イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0026】

またこのこの発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、工業的な利用の観点から、耐熱性分子であることが好ましい。従って、65℃以上で生育するThermus属、Methanococcus属やSulfolobus属等の細菌由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを使用することが好ましい。さらに、70℃以上でも生育することができる好熱菌Thermus thermophilus由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを使用することが特に好ましい。このThermus thermophilus由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドは配列番号1に示した塩基配列を有している。このThermus thermophilus由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド（Fサブユニット）、配列番号3のポリペプチド（Aサブユニット）、配列番号4のポリペプチド（Bサブユニット）および配列番号5のポリペプチド（Dサブユニットからなる複合体）をコードしている。従って、配列番号1の334-4196 nt配列を前記の遺伝子工学的的方法により発現させることにより、Aサブユニット3個、Bサブユニット3個およびDサブユニット1個からなる耐熱性 V_1 -ATPaseを得ることができる。また配列番号1の1-4196 nt配列を発現させることによって、DサブユニットにFサブユニット1個を結合した耐熱性 V_1 -ATPaseを得ることができる。

【0027】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseのさらに別の好ましい態様は、配列番号3における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方、さらに好ましくはこれらの置換の両方を有する改変型分子（以下、両方の置換を有する分子を「TSSA変異体」と記載することがある）である。すなわち、真核細胞のV-ATPaseと異なり、T. thermophilus等の細菌由来の V_1 -ATPaseは触媒の代謝回転の間、いわゆるMgADP阻害によって反応が中断するという傾向を有しており（J Biol Chem 273, 20504-20510, 1998）、通常はATPを基質として加えてから5分以内このADP抑制を示し、約10分間でATP加水分解を停止する。そこでこの出願の発明者らは幾つかの変異体を作成してADP抑制の効果を検討した結果、前記のTSSA変異体が、ATPを基質として加えてから1

時間もATP活性を持続させることを見出した。

【0028】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseのさらにまた別の好ましい態様は、AサブユニットまたはBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子である。すなわち、この固定によって、Dサブユニットの回転を効率よく伝達することが可能となる。このようなAおよび／またはBサブユニットの基板への結合は、例えば共有結合を用いた各種の方法によって行うことができるが、好ましくは、AサブユニットのN端にHisタグ（ヘクタヒスチジン）を結合させ、このHisタグをNi-NTAスライドに結合する方法（Nature 386:299-302, 1997；FEBS Letters 470:244-248, 2000）を採用することができる。

【0029】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseはまた、Dサブユニットにジョイント部材が結合していることを別の好ましい態様としている。この場合の「ジョイント部材」とは、 V_1 -ATPaseにおけるDサブユニットの回転運動を他の部材（例えば、ギアや運動機関のシャフト等）に伝達するための部材である。またこのジョイント部材は他の部材との連結用としてではなく、 V_1 -ATPaseの回転を観察するための「プローブ」、あるいは「プロペラ」としても利用することができる。このようなジョイント部材としては、例えば後記実施例に例示したようなビーズを複数個連結したもの（マイクロスフェア）や、あるいはアクチンフィラメント（Nature 386:299-302, 1997）等の微細繊維を利用することができる。そして、このようなジョイント部材は、DサブユニットのCys残基に、例えばマレイミド、ジスルフィド結合等によって結合することができる。ただし、配列番号5にアミノ酸配列を示したThermus thermophilus由来 V_1 -ATPaseのDサブユニットにはCys残基が存在しないため、適当な非Cys残基をCys残基に置換する必要がある。そこでこの発明は、配列番号5における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方（好ましくは両方）のCys残基にジョイント部材を結合していることを好ましい態様とする。また、Dサブユニット以外のCys残基（Aサブユニットの合計9個、Bサブユニットの合計3個）にジョイント部材が結合しないように、これらのCys残基を他の残基（例えばSer残基

) に置換することが好ましい。

【0030】

また、ジョイント部材はDサブユニットではなく、Dサブユニットに結合したFサブユニットに結合させることもできる。その場合には、例えば配列番号2のアミノ酸における第28番目Serおよび／または第35番目Ser残基をCys残基に置換し、これらのCys残基にジョイント部材を結合させればよい。

【0031】

なお、前記の各変異体V₁-ATPaseは、V₁-ATPaseポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸残基をコードするトリプレットを、ミューテーション・キット等を使用する方法、変異導入型のPCR法、ポリヌクレオチド合成法（例えば、Nucleic Acid Res. 25:3440-3444, 1997等）によって置換し、この変異型ポリヌクレオチドを遺伝子工学的的方法によって発現させることによって取得することができる。

【0032】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0033】

【実施例】

1. 材料と方法

1-1. タンパク質の調製

T. thermophilus HB8由来V₁-ATPaseのA、B、D、Fの各サブユニットをコードするDNA配列をlacプロモーター支配下に保持しているプラスミッドpUCV1によって形質転換した大腸菌株BL21-CodonPlus-RP(Stragene)を用いてV₁-ATPaseを発現させた。なお、A、B、D、Fの各サブユニットをコードするDNA配列には以下の変異体作成のための改変を加えた（アミノ酸位置は配列番号2-5に対応する）。

I: V₁-ATPase(A-His₈-tags/ΔCys/A-S232A/A-T235S/D-E48C/D-Q55C)

- (1) AサブユニットのN端にHisタグを結合 (A-His₈-tags)
- (2) AおよびBサブユニットの全てのCys残基がSer残基に置換 (ΔCys)
- (3) Aサブユニットの第232番目SerがAlaに置換 (A-S232A)
- (4) Aサブユニットの第235番目ThrがSerに置換 (A-T235S)

(5) Dサブユニットの第48番目GluがCysに置換 (D-E48C)

(6) Dサブユニットの第55番目GlnがCysに置換 (D-Q55C)

II: V₁-ATPase (A-Hisg-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C)

(1) AサブユニットのN端にHisタグを結合 (A-Hisg-tags)

(2) AおよびBサブユニットの全てのCys残基がSer残基に置換 (Δ Cys)

(3) Aサブユニットの第232番目SerがAlaに置換 (A-S232A)

(4) Aサブユニットの第235番目ThrがSerに置換 (A-T235S)

(7) Fサブユニットの第28番目SerがCysに置換 (S28C)

(8) Fサブユニットの第35番目SerがCysに置換 (S35C)

形質転換細胞を、0.3M NaClを含む20mM imidazole/HCl(pH8.0)に懸濁し、65℃で30分間熱処理をした後、熱に不安定なタンパク質を除き、Ni²⁺-affinity column(Amersham)に供して0.3M NaClを含む0.5M imidazole/HCl(pH8.0)で溶出した。緩衝液をかえ、限外濾過 (VIVA-Spin,VIVA science) し、RESOURCE Q columnに供した。V₁-ATPaseを含む部分をSuperdex 200 column (Amersham)にかけ、コンタミネーションしているタンパク質を除去した。精製されたV₁-ATPaseを2モル過剰の6-[N'-[2-(N-maleimido)ethyl] -N-piperazinylamido]hexyl D-biotinamide (biotin-PEAC₅-maleimide, Dojindo)でビオチン化した。25℃で15分間インキュベーションした後、タンパク質をPD-10 Column (Amersham) に供し、未反応試薬を除いた。DおよびFサブユニットのビオチン化は、streptavidin-alkaline phosphatase conjugate(Amersham)を用いて、ウエスタンブロッティングにより確認した (図2)。

1-2. 回転観察

5 μ lのフローセルを、2枚のカバースリップ (50nm厚のスペーサーを介在) から作成した。底のガラス表面はNi²⁺-nitrilotriacetic acidでコートし、ビオチン化したV₁-ATPase(0.1-1 μ M)を緩衝液 (50mM Tris-HCl,pH8.0,100mM KCl, 5mM MgCl₂, and 0.5%(w/v)BSA)からなるA溶液中でフローセルに注入し、Hisタグをガラスに結合させてV₁-ATPaseを固定した。

【0034】

0.1%(w/v)のStereptavidinでコートしたビーズ($\phi=0.56\mu\text{m}$, Bangs Laboratories inc.)溶液をフローセルに満たし、未結合ビーズは洗浄除去して、biotin-streptavidine結合によってDまたはFサブユニットにビーズを結合した。

【 0 0 3 5 】

V_1 -ATPase分子の回転は、所定濃度のATP中(0.2mg/ml creatine kinase と2.5 mM creatine phosphate ATP再生システム中)で、ビーズの回転を明視野顕微鏡(IX70, Olympus、倍率1000)を使用して観察した。また回転の状態はCCDカメラでビデオ記録した。なお、この V_1 -ATPaseの回転観察システムは、 F_1 -ATPaseの回転システム(Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13649-54, 2001)と同様である。すなわち、回転はDまたはFサブユニットに結合したビーズにより、斜めに結合された形で観察された(図2)。

1-3. その他のアッセイ

タンパク質濃度はUV測定によって行った。ATP加水分解活性は、pyruvate kinaseとlactate dehydrogenaseとをカップリングさせたNADH酸化により測定した。

2. 結果

2-1. 回転の観察

V_1 -ATPase(A-His₈-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/ D-E48C/D-Q55C)および V_1 -ATPase(A-His₈-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C)の2つの変異体について回転を観察した。2つの変異体は、同じようなMichaelis MentenタイプのKineticsを示し、 $K_m=0.3-0.5\text{mM}$, $V_{\text{max}}(\text{turnover rate})=\sim 10\text{sec}^{-1}$ を示した。これらの数値は、野生型のFoF₁-ATP合成酵素と同程度であった(J Biol Chem 273, 20504-1014, 1998)。

2-2. Dサブユニットの回転

ATPを含む緩衝液をフローセルに注入させる場合に、 V_1 -ATPaseのDサブユニットに結合したビーズの回転が観察された(図3A-3D)。一つのフローセルでは、5-10個の回転ビーズが観察された。

【 0 0 3 6 】

回転は一方向であり、 F_1 -ATPaseの回転方向と同様に、細胞膜側からみると常

に反時計回りであった。ATPを含まない緩衝液中では、ブラウン運動との区別がつく一方向の回転は観察されなかった。

【 0 0 3 7 】

アジド(Azide)はF₁-ATPaseのATPase活性も回転も阻害するが (Nature 386, 29 9-302, 1997)、V₁-ATPaseのATPase活性は阻害していないことが知られている (J Biol Chem 265, 21946-50, 1990)。変異体V₁-ATPaseの回転についても同様であり、アジド(Azide)は4mM ATP存在下 (図 3 A、B) や0.1mM ATP存在下でのV₁-ATPaseの回転に影響を与えなかった。

【 0 0 3 8 】

4mM ATP存在下での平均回転数は、約2.6 rps (revolutions per sec: 回転数/秒) 以下であった。1 mM ATP存在下での平均回転数は約2.4 rps以下であった。1 回転に3分子のATPが使用されると仮定すれば、回転速度は、バルクの酵素反応速度論 (～10 ATPsの加水分解/秒) から観察されるATP加水分解速度に良く一致している。また、0.5 mM ATPでは平均回転数は約2.2 rpsと低下している (図 3 C)

2-3. Fサブユニットの回転

F サブユニットに結合したビーズ回転も観察された。4 mM ATP濃度の条件では、1～3個の回転ビーズが観察された (図 4)。回転方向も常に反時計回りであった。回転速度は、約2.5 rpsであり、Dサブユニットの回転速度と同程度であった。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、新規の回転モーター分子としてのV₁-ATPaseが提供される。また、この回転モーター分子V₁-ATPaseのさらに実用的形態としての各種変異体V₁-ATPaseが提供される。これらは、マイクロマシンやナノマシン等の作成に大きく寄与する。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A Rotary Motor molecule V1-ATPase

<130> NP02447-YS

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4199

<212> DNA

<213> *Thermus thermophilus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<220>

<221> CDS

<222> (334)..(2067)

<220>

<221> CDS

<222> (2081)..(3514)

<220>

<221> CDS

<222> (3528)..(4196)

<400> 1

gtg agg atg gcg gtg atc gcc gat ccc gag acc gcc cag ggg ttc cgg 48

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg

1 5 10 15

ctc gcg ggc ctc gag ggc tac ggg gcc tct tcg gcg gag gag gcc caa 96

Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln

20 25 30

agc ctc ctg gaa acc ctc gtg gag cgg ggc ggc tac gcc ctg gtg gcc 144

Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala

35 40 45

gtg gac gag gcg ctc ctc ccc gac ccc gag cgg gcg gtg gag cgc ctc 192

Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu

50 55 60

atg cgg ggc agg gac ctc ccc gtg ctc ctg ccc atc gcg ggg ctg aag 240

Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys

65 70 75 80

gag gcc ttc cag ggg cac gac gtg gaa ggc tac atg cgg gag ctg gtg 288

Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val

85	90	95	
agg aag acc atc ggc ttt gac atc aag ctg tagaatggag ggacg atg atc			339
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu			Met Ile
100	105		
caa ggg gtg atc cag aag atc gcg ggc ccg gcg gtg atc gcc aag ggc			387
Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala Lys Gly			
110	115	120	
atg ctc ggg gcc cgc atg tac gac atc tgc aag gtg ggc gaa gag ggc			435
Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu Glu Gly			
125	130	135	140
ctc gtg ggc gag atc atc cgc ctg gac ggg gac acg gcc ttc gtc cag			483
Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe Val Gln			
145	150	155	
gtc tac gag gac acc tcg ggc cta aag gtg ggg gag ccc gtg gtc tcc			531
Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val Val Ser			
160	165	170	
acg ggg ctt ccc ttg gcg gtg gag ctc ggc ccc ggg atg ctg aac ggc			579
Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu Asn Gly			
175	180	185	
atc tac gac ggc atc cag cgc ccc ctg gag cgc atc cgg gag aag acg			627
Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu Lys Thr			
190	195	200	

ggg atc tac atc acc cgg ggc gtg gtg gtc cac gcc ctg gac cgg gag 675

Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp Arg Glu

205 210 215 220

aag aag tgg gcc tgg acg ccc atg gtc aag ccc ggg gac gag gtg cgg 723

Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Arg

225 230 235

ggg ggt atg gtc ctg ggc acg gtg ccc gag ttc ggc ttc acc cac aag 771

Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr His Lys

240 245 250

atc ctg gta ccc ccg gac gtg cgg ggc cgg gtc aag gag gtg aag ccc 819

Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val Lys Pro

255 260 265

gcc ggg gag tac acc gtg gag gag ccg gtg gtg gtc ctc gag gac ggc 867

Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu Asp Gly

270 275 280

acc gag ctc aag atg tac cac acc tgg ccc gtt cgc cgg gcg agg ccc 915

Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala Arg Pro

285 290 295 300

gtg caa agg aag ctt gac ccc aac acc ccc ttc ctc acg ggg atg cgc 963

Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly Met Arg

305 310 315

atc ctg gac gtc ctc ttc ccc gtg gcc atg ggg ggc acc gcc gcc atc 1011
Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala Ala Ile
320 325 330

cct ggg ccc ttc ggc agc ggc aag acc gtg acc cag cag tcc ctg gcc 1059
Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser Leu Ala
335 340 345

aag tgg tcc aac gcc gac gtg gtg gtc tac gtg ggc tgc ggg gag cgg 1107
Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly Glu Arg
350 355 360

ggg aac gag atg acc gac gtg ctc gtg gag ttc ccc gag ctc acc gac 1155
Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu Thr Asp
365 370 375 380

ccc aag acg ggg ggg ccc ttg atg cac cgc acc gtc ctc atc gcc aac 1203
Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile Ala Asn
385 390 395

acc tcc aac atg ccc gtg gcc gcc cgc gag gcc agc atc tac gtg ggc 1251
Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr Val Gly
400 405 410

gtg acc atc gcc gag tac ttc cgc gac cag ggc ttc tcc gtg gcc ctc 1299
Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val Ala Leu
415 420 425

atg gcc gac tcc acg agc cgc tgg gcc gag gct ttg cgc gag atc tct 1347

Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu Ile Ser

430

435

440

agc cgc ctc gag gag atg ccc gcc gag gag ggc tac ccg ccc tac ctc 1395

Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro Tyr Leu

445

450

455

460

gcc gcc agg ctc gcc gcc ttc tac gag cgg gcg ggc aag gtc atc acc 1443

Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val Ile Thr

465

470

475

ctg ggc ggc gag gag ggg gcg gtg acc atc gtg ggg gcc gtc tcc ccg 1491

Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val Ser Pro

480

485

490

ccg ggc ggc gac atg tcc gag ccc gtg acc cag tcc acc ttg agg atc 1539

Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu Arg Ile

495

500

505

gtg ggg gcc ttc tgg cgg ctt gac gcc tcc ctg gcc ttc cgc cgc cac 1587

Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg Arg His

510

515

520

ttc ccc gcc atc aac tgg aac ggc tcc tac agc ctc ttc acc tcc gcc 1635

Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Ser Ala

525

530

535

540

ctt gac ccc tgg tac cgg gag aac gtg gcc gag gac tac ccc gag ctc 1683

Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro Glu Leu

545	550	555	
cgc gac gcc atc tcc gag ctt ttg cag cgg gag gcg ggc ctc cag gag	1731		
Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu Gln Glu			
560	565	570	
atc gtc cag ctc gtg ggg ccg gac gcc ctc cag gac gcc gag cgc ctc	1779		
Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu Arg Leu			
575	580	585	
gtc att gag gtg ggc cgg atc atc cgc gag gac ttc ctg cag cag aac	1827		
Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln Gln Asn			
590	595	600	
gcc tac cac gag gtg gac gcc tac tgc tcc atg aag aag gcc tac ggg	1875		
Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala Tyr Gly			
605	610	615	620
atc atg aag atg atc ctc gcc ttc tac aag gag gcg gag gcg gcc atc	1923		
Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala Ala Ile			
625	630	635	
aag cgg ggg gtt tcc ata gac gag atc ctg cag ctc ccc gtt ctg gag	1971		
Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu			
640	645	650	
cgc atc ggc cgc gcc cgc tac gtg agc gag gag gag ttc ccc gcc tac	2019		
Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro Ala Tyr			
655	660	665	

ttt gag gag gcc atg aag gag atc cag ggg gcc ttc aag gcc ctg gcc 2067
Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala Leu Ala
670 675 680

taaaggggga gag atg gac ctt ctg aag aag gag tac acg ggc atc acc 2116
Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr
685 690 695

tac atc tcg ggg cct ctt ctc ttc gtg gag aac gcc aag gac ctg gcc 2164
Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala
700 705 710

tac ggg gcc atc gtg gac atc aag gac ggc acg ggc cgg gtc cgc ggc 2212
Tyr Gly Ala Ile Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly
715 720 725

ggc cag gtg att gag gtc tcc gag gag tac gcc gtc atc cag gtg ttt 2260
Gly Gln Val Ile Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe
730 735 740

gag gaa acc act ggg ctg gac ctg gcc acg acc agc gtg agc ctg gtg 2308
Glu Glu Thr Thr Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val
745 750 755 760

gag gac gtg gcc cgg ctt ggg gtc tcc aag gag atg ctg ggc cgc cgc 2356
Glu Asp Val Ala Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg
765 770 775

ttc aac ggc atc ggc aag ccc ata gac ggc ctg ccg ccc atc acc ccg 2404
 Phe Asn Gly Ile Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro
 780 785 790

gag aag cgg ctc ccc atc acc ggc ctt ccc tta aac ccc gtg gcc cgg 2452
 Glu Lys Arg Leu Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg
 795 800 805

agg aag ccg gag cag ttc atc cag acg ggc atc tcc acc att gac gtg 2500
 Arg Lys Pro Glu Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val
 810 815 820

atg aac acc ctg gtc cgg ggg cag aag ctt ccc atc ttc tcc ggc tcg 2548
 Met Asn Thr Leu Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser
 825 830 835 840

ggg ctt ccc gcc aac gag atc gcc gcc cag atc gcc cgc cag gcc acg 2596
 Gly Leu Pro Ala Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr
 845 850 855

gtg cgc ccc gac ctc tcc ggg gag ggg gag aag gag gag ccc ttc gcc 2644
 Val Arg Pro Asp Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala
 860 865 870

gtg gtc ttc gcc gcc atg ggg atc acg cag cgg gag ctc tcc tac ttc 2692
 Val Val Phe Ala Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe
 875 880 885

atc cag gag ttt gag cgc acc ggg gcc ctg agc cgc tcc gtc ctc ttc 2740

Ile Gln Glu Phe Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe
 890 895 900

ctg aac aag gcg gac gac ccc acc att gag cgc atc ctc acc ccc cgc 2788
 Leu Asn Lys Ala Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg
 905 910 915 920

atg gcc ctc acc gtg gcc gag tac ctg gcc ttt gag cac gac tac cac 2836
 Met Ala Leu Thr Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His
 925 930 935

gtc ctc gtc atc ctc acg gac atg acc aac tac tgc gag gcc ttg cgg 2884
 Val Leu Val Ile Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg
 940 945 950

gag atc ggg gcc gcc cgc gag gag atc ccg ggc cgc cgc ggt tac ccc 2932
 Glu Ile Gly Ala Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro
 955 960 965

ggc tac atg tac acc gac ctg gcc acc atc tac gag cgc gcc ggg gtg 2980
 Gly Tyr Met Tyr Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val
 970 975 980

gtg gag ggg aag aag ggg agc gtg acc cag atc ccc atc ctc tcc atg 3028
 Val Glu Gly Lys Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met
 985 990 995 1000

ccc gac gac gac cgc acc cac ccc atc ccc gac ctc acg ggc tac atc 3076
 Pro Asp Asp Asp Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile

1005	1010	1015	
acc gag ggg cag atc cag ctc tcc cgg gag ctc cac cgc aag ggc atc			3124
Thr Glu Gly Gln Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile			
1020	1025	1030	
tac ccg ccc att gac ccc ttg ccc tcc ctc tcc cgg ctc atg aac aac			3172
Tyr Pro Pro Ile Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn			
1035	1040	1045	
ggc gtg ggc aag ggc aag acc cgg gag gac cac aag cag gtc tcc gac			3220
Gly Val Gly Lys Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp			
1050	1055	1060	
cag ctc tac tcc gcc tac gcc aac ggg gtg gac atc cgg aag ctc gtg			3268
Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val			
1065	1070	1075	1080
gcc atc atc ggc gag gac gcc ctc acg gag aac gac cgc cgt tac ctc			3316
Ala Ile Ile Gly Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu			
1085	1090	1095	
cag ttc gcc gac gcc ttt gaa cgg ttc ttc atc aac cag ggg cag cag			3364
Gln Phe Ala Asp Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln			
1100	1105	1110	
aac cgc tcc att gag gag agc ctg cag atc gcc tgg gcc ctc ctc tcc			3412
Asn Arg Ser Ile Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser			
1115	1120	1125	

atg ctg ccc cag ggc gag ctc aag cgc atc tcc aag gac cac atc ggc 3460
 Met Leu Pro Gln Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly
 1130 1135 1140

aag tac tac ggc cag aag ctg gag gag atc tgg ggc gcg ccc cag gcc 3508
 Lys Tyr Tyr Gly Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala
 1145 1150 1155 1160

ctg gac taagggaggg tag atg agc cag gtg agc ccc acc cgg atg aac 3557
 Leu Asp Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn
 1165 1170

ctt ctg cag agg cgg ggg cag ctc cgc ctg gcg cag aag ggg gtg gac 3605
 Leu Leu Gln Arg Arg Gly Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp
 1175 1180 1185

ctc ctc aag aag aag cgg gac gcc ctg gtg gcc gag ttc ttc ggc ctg 3653
 Leu Leu Lys Lys Lys Arg Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu
 1190 1195 1200

gtg cgg gag gcc atg gag gcc agg aag gcc ctg gac cag gcg gcc aag 3701
 Val Arg Glu Ala Met Glu Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys
 1205 1210 1215 1220

gag gcc tac gcc gcc ctc ctc ctg gcc cag gcc ttt gac ggg ccg gag 3749
 Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu
 1225 1230 1235

gtg gtg gcg ggg gcg gcc ctt ggg gtc ccg ccc ctc gag ggg gtg gag 3797

Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu

1240

1245

1250

gcg gag gtg gag aac gtc tgg ggg agc aag gtg ccg agg ctc aag gcc 3845

Ala Glu Val Glu Asn Val Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala

1255

1260

1265

acc ttc ccc gac ggg gcc ctc ctt tcc ccg gtg ggg acc ccg gcc tac 3893

Thr Phe Pro Asp Gly Ala Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr

1270

1275

1280

acc ctc gag gcc agc cgg gcc ttc cgc cgc tac gcc gag gcc ctg atc 3941

Thr Leu Glu Ala Ser Arg Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile

1285

1290

1295

1300

cgg gtg gcc aac acc gag acc cgc ctg aag aag atc ggg gag gag atc 3989

Arg Val Ala Asn Thr Glu Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile

1305

1310

1315

aag aag acc acg cgg cgg gtg aac gcc ctg gag cag gtg gtg atc ccg 4037

Lys Lys Thr Thr Arg Arg Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro

1320

1325

1330

ggg atc cgc gcc cag atc cgc ttc atc cag cag gtc ctg gag cag cgg 4085

Gly Ile Arg Ala Gln Ile Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg

1335

1340

1345

gaa cgg gag gac acc ttc cgc ctc aag cgc atc aag ggc aag att gag 4133

Glu Arg Glu Asp Thr Phe Arg Leu Lys Arg Ile Lys Gly Lys Ile Glu
 1350 1355 1360

gcc cgg gag gcc gag gag gag ggc ggc cgg ccc aac ccg cag gtg gag 4181
 Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Gly Gly Arg Pro Asn Pro Gln Val Glu
 1365 1370 1375 1380

atc ggg gcg ggc ctt taa 4199
 Ile Gly Ala Gly Leu
 1385

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Thermus thermophilus

<400> 2

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln
 20 25 30
 Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala
 35 40 45
 Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu
 50 55 60
 Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val

	85	90	95
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu			
100	105		

<210> 3

<211> 578

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 3

Met Ile Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala			
1	5	10	15
Lys Gly Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu			
20	25	30	
Glu Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe			
35	40	45	
Val Gln Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val			
50	55	60	
Val Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu			
65	70	75	80
Asn Gly Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu			
85	90	95	
Lys Thr Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp			
100	105	110	
Arg Glu Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu			
115	120	125	
Val Arg Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr			
130	135	140	

His Lys Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu
 165 170 175
 Asp Gly Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala
 180 185 190
 Arg Pro Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly
 195 200 205
 Met Arg Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala
 210 215 220
 Ala Ile Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly
 245 250 255
 Glu Arg Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu
 260 265 270
 Thr Asp Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile
 275 280 285
 Ala Asn Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr
 290 295 300
 Val Gly Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val
 305 310 315 320
 Ala Leu Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Ile Ser Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val
 355 360 365
 Ile Thr Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val

370	375	380
Ser Pro Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu		
385	390	395
Arg Ile Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg		
	405	410
Arg His Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr		
	420	430
Ser Ala Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro		
	435	440
Glu Leu Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu		
	450	455
Gln Glu Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu		
465	470	475
Arg Leu Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln		
	485	490
Gln Asn Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala		
	500	505
Tyr Gly Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala		
	515	520
Ala Ile Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val		
	530	535
Leu Glu Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro		
545	550	555
Ala Tyr Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala		
	565	570
Leu Ala		575

<211> 478

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 4

Met	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Glu	Tyr	Thr	Gly	Ile	Thr	Tyr	Ile	Ser	Gly
1				5					10					15	
Pro	Leu	Leu	Phe	Val	Glu	Asn	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ile
				20				25					30		
Val	Asp	Ile	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Arg	Val	Arg	Gly	Gly	Gln	Val	Ile
			35				40					45			
Glu	Val	Ser	Glu	Glu	Tyr	Ala	Val	Ile	Gln	Val	Phe	Glu	Glu	Thr	Thr
			50				55				60				
Gly	Leu	Asp	Leu	Ala	Thr	Thr	Ser	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Val	Ala
			65			70				75				80	
Arg	Leu	Gly	Val	Ser	Lys	Glu	Met	Leu	Gly	Arg	Arg	Phe	Asn	Gly	Ile
				85					90				95		
Gly	Lys	Pro	Ile	Asp	Gly	Leu	Pro	Pro	Ile	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu
			100					105					110		
Pro	Ile	Thr	Gly	Leu	Pro	Leu	Asn	Pro	Val	Ala	Arg	Arg	Lys	Pro	Glu
			115				120					125			
Gln	Phe	Ile	Gln	Thr	Gly	Ile	Ser	Thr	Ile	Asp	Val	Met	Asn	Thr	Leu
			130				135				140				
Val	Arg	Gly	Gln	Lys	Leu	Pro	Ile	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Ala
			145			150				155				160	
Asn	Glu	Ile	Ala	Ala	Gln	Ile	Ala	Arg	Gln	Ala	Thr	Val	Arg	Pro	Asp
				165				170					175		
Leu	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Lys	Glu	Glu	Pro	Phe	Ala	Val	Val	Phe	Ala
			180					185					190		

Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe Ile Gln Glu Phe
 195 200 205
 Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe Leu Asn Lys Ala
 210 215 220
 Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg Met Ala Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His Val Leu Val Ile
 245 250 255
 Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ala
 260 265 270
 Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro Gly Tyr Met Tyr
 275 280 285
 Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val Val Glu Gly Lys
 290 295 300
 Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met Pro Asp Asp Asp
 305 310 315 320
 Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly Gln
 325 330 335
 Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Pro Ile
 340 345 350
 Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn Gly Val Gly Lys
 355 360 365
 Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp Gln Leu Tyr Ser
 370 375 380
 Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val Ala Ile Ile Gly
 385 390 395 400
 Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu Gln Phe Ala Asp
 405 410 415
 Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln Asn Arg Ser Ile

420 425 430
 Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser Met Leu Pro Gln
 435 440 445
 Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly Lys Tyr Tyr Gly
 450 455 460
 Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala Leu Asp
 465 470 475

<210> 5
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Thermus thermophilus*

<400> 5
 Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn Leu Leu Gln Arg Arg Gly
 1 5 10 15
 Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp Leu Leu Lys Lys Lys Arg
 20 25 30
 Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu Val Arg Glu Ala Met Glu
 35 40 45
 Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Leu
 50 55 60
 Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu Val Val Ala Gly Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu Ala Glu Val Glu Asn Val
 85 90 95
 Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala Thr Phe Pro Asp Gly Ala
 100 105 110

Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr Thr Leu Glu Ala Ser Arg
 115 120 125
 Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile Arg Val Ala Asn Thr Glu
 130 135 140
 Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile Lys Lys Thr Thr Arg Arg
 145 150 155 160
 Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro Gly Ile Arg Ala Gln Ile
 165 170 175
 Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg Glu Arg Glu Asp Thr Phe
 180 185 190
 Arg Leu Lys Arg Ile Lys Gly Lys Ile Glu Ala Arg Glu Ala Glu Glu
 195 200 205
 Glu Gly Gly Arg Pro Asn Pro Gln Val Glu Ile Gly Ala Gly Leu
 210 215 220

【図面の簡単な説明】

【図 1】

V₁-ATPaseの回転観察の状態を示した模式図である。矢印は回転方向を示す。

【図 2】

DまたはFサブユニットのビオチン化を確認したウェスタンブロット分析の結果である。左側（レーン1-4）はCBB染色、右側（レーン5-8）はalkaline phosphatase-streptavidineコンジュゲート染色である。レーン1および5はDサブユニットがビオチン化されたV₁-ATPase、レーン2および6はビオチン化されたFサブユニットを持つV₁-ATPase、レーン3および7はビオチン化されていないV₁-ATPase、レーン4および8は分子量マーカーである。

【図 3】

Dサブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を測定した結果である。Aは4 mM ATP、0.5 mM sodium azide存在下でのビーズの回転である。B-Dはsodium azi

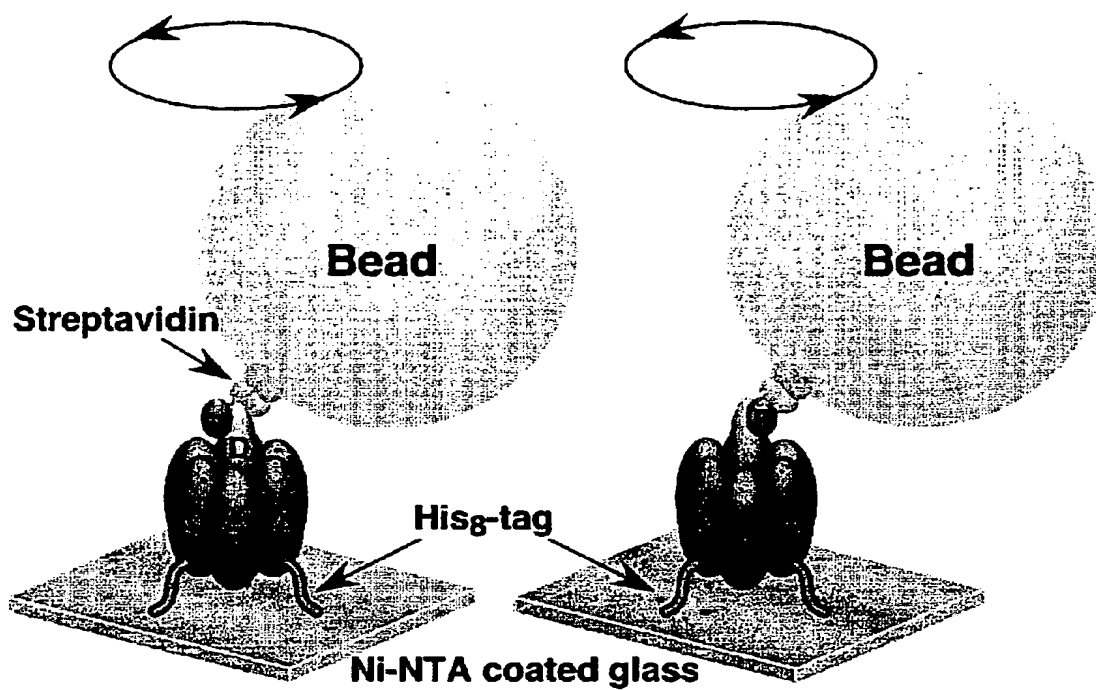
de非存在下で、Bは4 mM ATP、Cは0.5 mM ATP、Dは0.2 mM ATP溶液中でのビーズ回転の結果である。

【図 4】

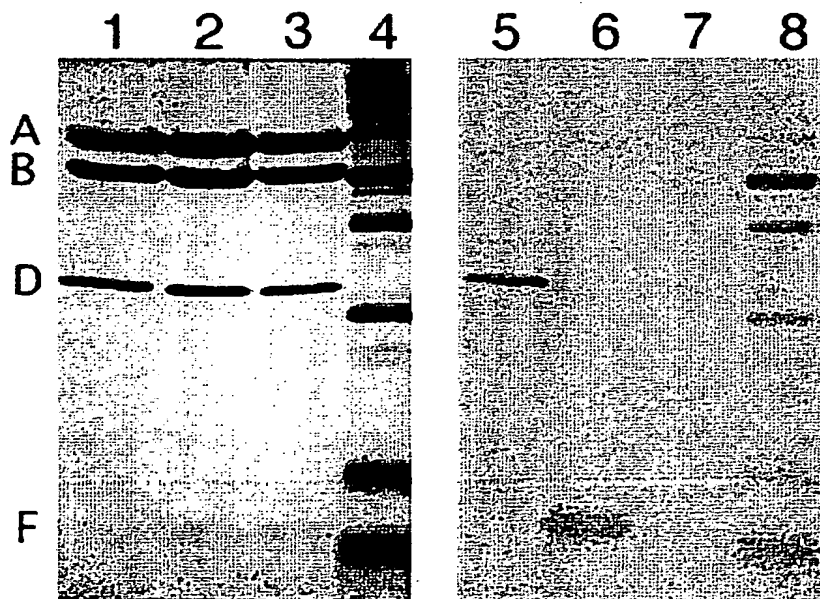
Fサブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を、4 mM ATP溶液中で測定した結果である。

【書類名】 図面

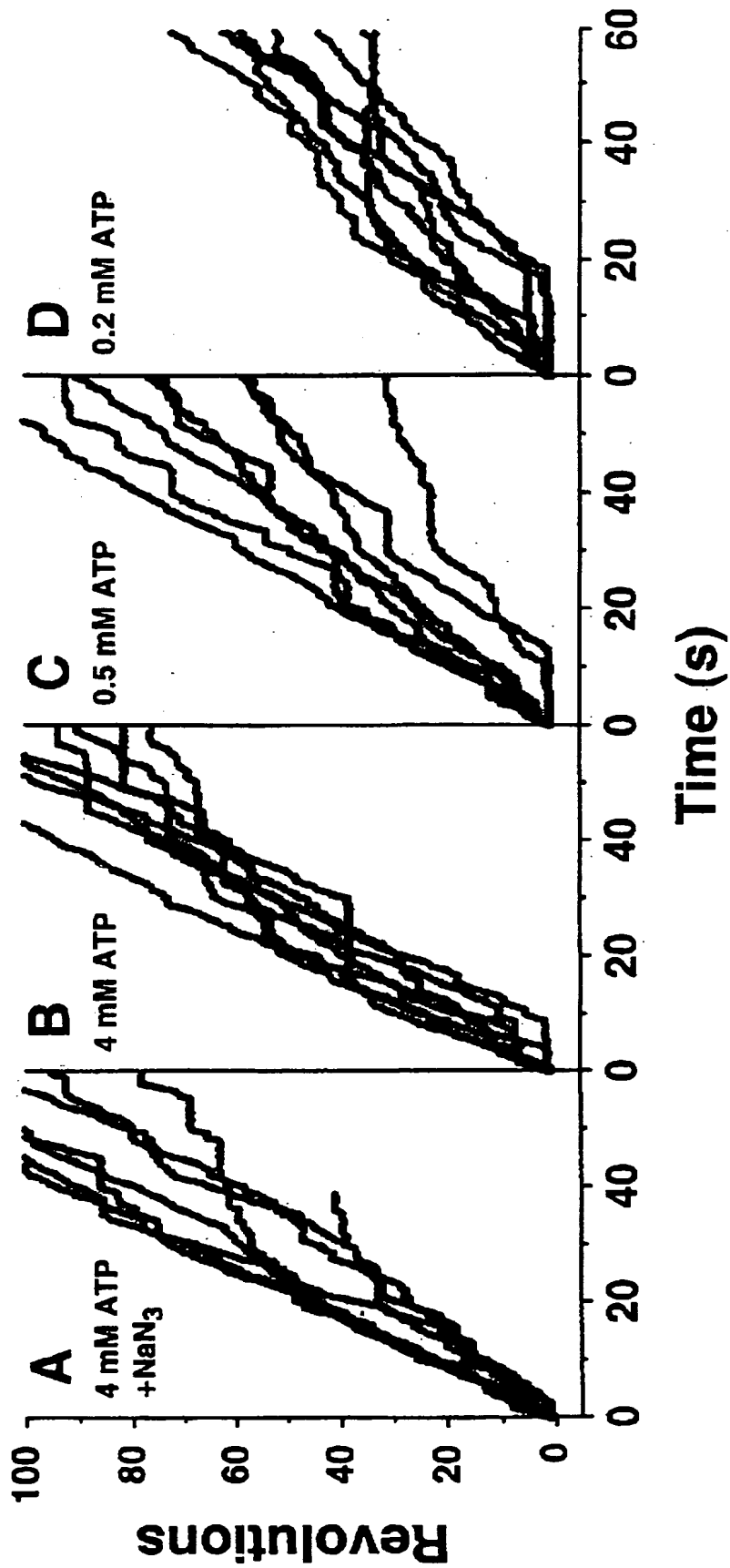
【図 1】



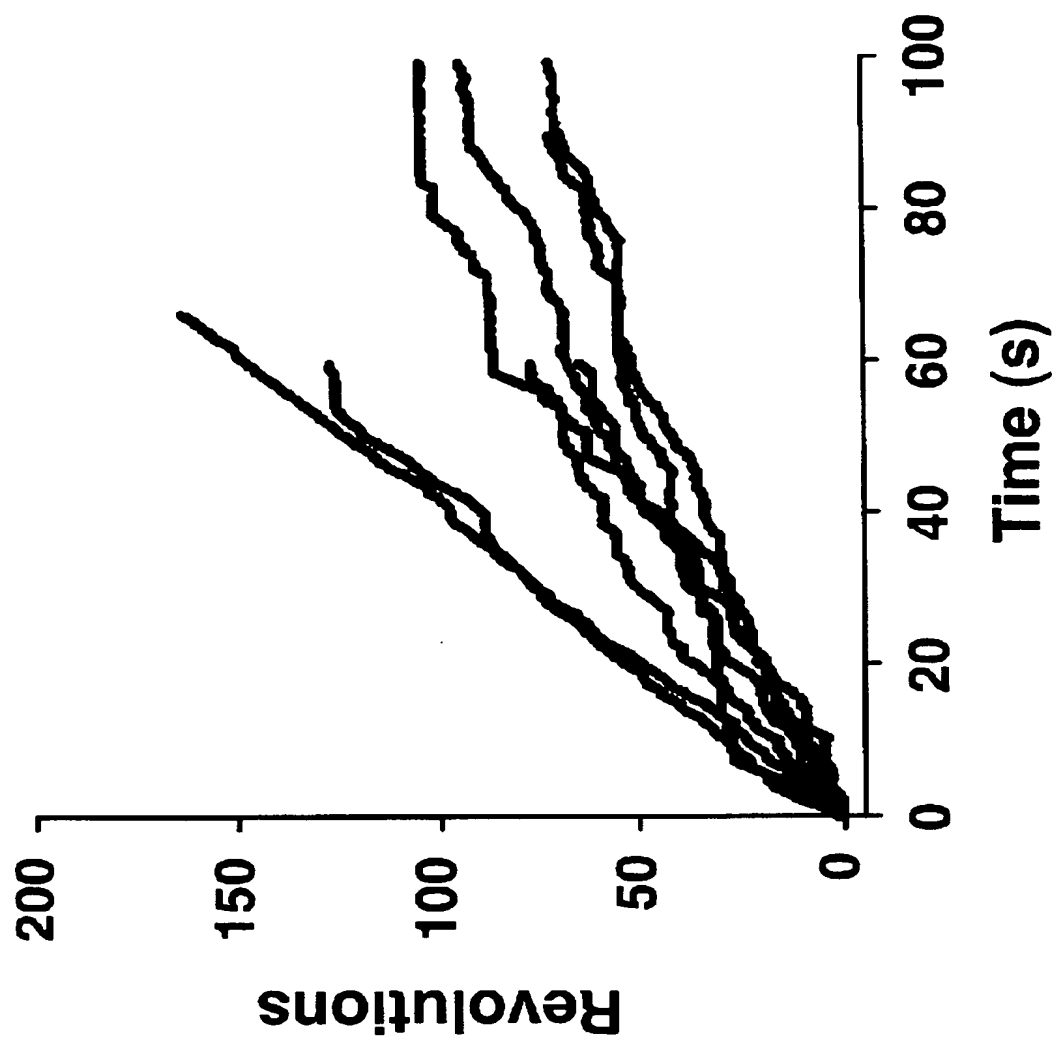
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供する。

【解決手段】 V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分を構成するAサブユニット 3 個、Bサブユニット 3 個、Dサブユニット 1 個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子 V_1 -ATPase。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-337212
【承継人】
 【識別番号】 503360115
 【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
 【代表者】 沖村 憲樹
 【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法
人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 0
3-5214-8486 FAX 03-5214-8417
【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかか
る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかか
る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 2 - 3 3 7 2 1 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 2 - 3 3 7 2 1 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

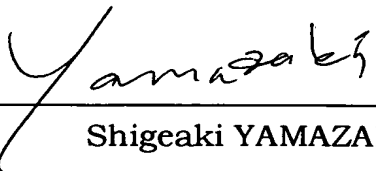
1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	独立行政法人 科学技術振興機構



CERTIFICATE

I, Shigeaki YAMAZAKI, a citizen of Japan, residing at 4-3-14, Kudan-Kita, Chiyoda-ku, Tokyo, JAPAN hereby certify that I am conversant with the English and Japanese language, and I further certify that to the best of my knowledge and belief attached herewith is a true and correct English translation of the Japanese Patent Application No. 337212/2002.

Signed this 19th day of December, 2008



Shigeaki YAMAZAKI

[Document] Specification

[Title of Invention] Rotary Motor Molecule V_1 -ATPase

[CLAIMS]

[1] A rotary motor molecule V_1 -ATPase rotating in the presence of ATP, which is a complex molecule having three A subunits, three B subunits and one D subunit constituting the V_1 portion of a V_0V_1 -ATPase.

[2] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 1, which has heat resistance.

[3] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 2, which is derived from a thermophile bacteria, *Thermus thermophilus*.

[4] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 3, which is a complex molecule having three peptides of SEQ ID NO:3 corresponding to the A subunit, three peptides of SEQ ID NO:4 corresponding to the B subunit, and one peptide of SEQ ID NO:5 corresponding to the D subunit.

[5] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 4, which has at least one substitution of Ala residue for the 232nd Ser residue and Ser residue for the 235th Thr residue in SEQ ID NO:3.

[6] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of any one of claims 1 to 5, wherein at least one of the A subunit and the B subunit thereof is fixed on a substrate.

[7] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 6, which is fixed on the substrate via a His tag bound to the N terminal of the A subunit.

[8] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of any one of claims 1 to 7, to which a D subunit is bound with a joint material.

[9] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 8, wherein the joint is bound to at least one of Cys residue substituted for the 48th Glu residue and Cys residue substituted for the 55th Gln residue in SEQ ID NO: 5.

[10] The rotary motor molecule V_1 -ATPase of claim 9, wherein all Cys residues in the A subunit and the B subunit are replaced by non-Cys residues.

[Detailed Description of Invention]

[0001]

[Technical Field]

The present invention relates to a novel rotary motor molecule V_1 -ATPase useful for a nanoactuator of a micromachine or a nanomachine, or the like.

[0002]

[Background Art]

Attention is being given to the development of a micromachine or a nanomachine that mechanically moves according to the size of a molecule. This is because such micromachine or nanomachine is considered useful for, e.g., a molecule robot that lays out the wiring of a molecule computer or a medical robot that works a cure in the body.

[0003]

For the fabrication of a micromachine and a nanomachine, development of a variety of technologies is required, including individual element devices (a sensor, an actuator and a miniature machine) to processes of assembling them (micromachining and nanomaching). In particular, the development of microactuators and nanoactuators (rotary motors), i.e., micromachine drive devices, is essential for self-regulating movement of machines, and the development of motor devices utilizing diverse precise handling technologies is being pursued. However, even microactuators made by processes to which precise handling technologies are applied are no smaller than about 100 μm . Further miniaturization of motor apparatuses is being required to install them in micromachines and nanomachines.

[0004]

Thus, aside from construction of a motor by precise handling technology, utilization of a single molecule having rotary movement capability as a motor is proposed.

[0005]

In general, a molecule capable of being a motor needs to satisfy two factors: having a power mechanism that converts outer energy into rotary movement, and achieving rotation in one direction. Low molecular organic compounds satisfying such conditions that are known include, for example, (3R,3'R)-(P,P)-trans-1,1',2,2',3,3',4,4'-octahydro-3,3'-dimethyl-4,4'-bipheant hrydiene (Non-patent document 1) and Triptycyl(4)helicene (Non-patent document 2). The former has symmetry to the right and to the left of the carbon-carbon double bond, but has a twisted structure due to steric interlocking. Addition of suitable heat or light thereto makes it possible to rotate the molecule in one direction through four process steps. Also, one cycle is completed through two light reactions and a heat isomerization, with the movement proceeding in one direction only. In other words, this organic compound conducts rotary motion via heat isomerization and light reaction. Rotation via light reaction is very rapid (a level of picoseconds), but rotation via heat isomerization needs a few minutes, and so is unsuitable for actual use. Furthermore, the compound poses the problem that the driving force of rotation is extremely weak. On the other hand, the heat isomerization causes one-direction rotation of the molecule utilizing the chemical reactions of phosgene addition and the formation and cleavage of urethane bonding. However, this molecule is incapable of repeating rotation, a fatal defect for an actuator.

[0006]

On the other hand, as a single molecule motor capable of being utilized in a micromachine, a nanomachine or the like, biomolecules are known that include a flagellum motor (Non-patent documents 3 and 4), an ATP synthase (Non-patent document 5), a myosin motor (Non-patent documents 6 and 7), a microtubule-based motor (Non-patent document 8), a motor protein of nucleic acid synthase (Non-patent document 9), and the like.

[0007]

Of these, an ATP synthase is a membrane protein present ubiquitous, at such locations as the inner membranes of mitochondria in eukaryotes, thylakoid membranes of chloroplasts, a prokaryote cell membrane, and the like, and synthesizes most ATP consumed in cells. An ATP synthase (F_0F_1 -ATP synthase) is a huge membrane protein complex with molecular weight up to about 500 thousand, and consists of an F_0 portion present inside a membrane and an F_1 portion present outside the membrane. The F_0 portion is a passage for a proton (H^+) to pass through the membrane, and the F_1 portion is a catalyst portion that synthesizes and hydrolyzes ATP. The molecular weight of the F_1 portion is about 380 thousand, for example, the subunit composition of the F_1 portion in an ATP synthase derived from bacteria is $\alpha_3\beta_3\delta\gamma_1\varepsilon_1$. α and β subunits both have a similar ATP binding portion, but catalyst activity is present in the β subunit. Both alternately align to form a ring and in the center of this $\alpha_3\beta_3$ ring, a γ subunit is present. A δ subunit binds to the top of the $\alpha_3\beta_3$ ring; an ε subunit that controls ATP hydrolysis activity binds to the γ subunit. On the other hand, the F_0 portion has a molecular weight of about 100 thousands, and the amino acid composition contains in quantity glutamic acid and asparaginic acid, necessary for proton movement. The subunit composition is $a_1b_2c_{9-12}$, "c" subunits are arranged like a ring (the "c" ring) in the membrane, and to the "c" ring are bound subunit "a" and two "b" subunits each having an arm protruding far outside the membrane. Hence, an F_0F_1 -ATP synthase has an F_1 portion and an F_0 portion which are bound to each other at two sites: $\gamma\varepsilon$ -"c" ring and δb_2 . A further characteristic is the fact that this F_0F_1 -ATP synthase molecule has two kinds of torque generating devices. One is an ATP driving type device present in the F_1 portion and the other is a proton driving type device present in the F_0 portion. That is, when the F_0 portion takes a proton in the cell membrane, the "c" ring rotates clockwise; when the F_0 portion

discharges a proton to the outside of the cell membrane, the "c" ring rotates anticlockwise. On the other hand, during ATP synthesis, the F_1 portion rotates clockwise viewing the γ subunit from the F_0 side, and the F_1 portion rotates anticlockwise during ATP decomposition. By providing these two kinds of torque generating devices, the torque generated by ATP synthase is on the order of tens of piconewton·nm, and thus the synthase has a sufficient driving force for a molecule motor. Additionally, an ATP synthase acts in a water system and so it is most suitable as an actuator working in the body, and also can manipulate a protein, sugar, a lipid, or a nucleic acid in the body because it has sufficient power for moving actin.

[0008]

The inventors of the present invention improved this F_0F_1 -ATP synthase molecule, and have already invented and filed the invention of a modified F_0F_1 -ATP synthase molecule capable of controlling over a wide rotation speed range and its utilization (Japanese Patent Application No. 2002-148232; filing date: May 22, 2002). In addition, recently, reported was a rotary motor molecule, which is made by incorporating a zinc binding site into an F_1 -ATP synthase molecule and which is capable of controlling the initiation and stop of the rotation by means of the zinc (Non-patent document 10).

[0009]

[Non-patent document 1] Nature 401: 152-155, 1999

[Non-patent document 2] Nature 401: 150-152, 1999

[Non-patent document 3] Microbiol. 6: 1-18, 1967

[Non-patent document 4] Nature 245: 380-382, 1973

[Non-patent document 5] Nature 386: 299-302, 1997

[Non-patent document 6] Biochem. Biophys. Res. Comm. 199: 1057-1063, 1994

[Non-patent document 7] Curr. Opin. Cell Biol. 7: 89-93, 1995

[Non-patent document 8] Cell 42: 39-50, 1985

[Non-patent document 9] Nature 409: 113-119, 2001

[Non-patent document 10] Nature Materials 1: 173-177, 2002

[0010]

[Problems to be solved]

As described above, various rotary motor molecules are proposed as driving members of a micromachine, a nanomachine, and the like, and the molecules each have characteristics regarding type of rotation, the revolution number, torque, the method of controlling rotation, etc. Accordingly, for actual fabrication of a micromachine or a nanomachine, an appropriate molecule needs to be selected from a variety of candidate molecules depending on its application and machine construction. However, it cannot be said that the rotary motor molecules reported thus far can each be suitable for all the different applications and constructions of a micromachine and a nanomachine. For this reason, upon the development of a micromachine or a nanomachine or the like, each addition of one more to the lineup of rotary motor molecules is greatly desired.

[0011]

Thus, this application is intended to provide a novel rotary motor molecule that is different in properties from the conventional rotary motor molecules.

[0012]

In addition, the application also has another subject of providing an improved, novel rotary motor molecule which further smoothens the rotary motion and also adds a means for the molecule to transfer the rotary motion.

[0013]

[Solutions for the Problems]

This application, as the invention for solving the above-described problem, provides a rotary motor molecule V_1 -ATPase rotating in the

presence of ATP, which is a complex molecule having three A subunits, three B subunits and one D subunit constituting the V_1 portion of a V_0V_1 -ATPase.

[0014]

The V_1 -ATPase of this invention includes the A subunit as a catalyst portion, A and B subunits are arranged alternately, and from a hexamer cylinder like the $\alpha_3\beta_3$ of a V_0V_1 -ATPase. The D subunit is embedded in the central cavity of this A_3B_3 cylinder, an F subunit is bound to the D subunit, and the D and F subunits act as a rotor (rotary shaft, rotary axis).

[0015]

In one mode of this invention, the rotary motor molecule V_1 -ATPase is heat resistant, and in this case it is preferred that the V_1 -ATPase is derived from the thermophile bacteria, *Thermus thermophilus*.

[0016]

Further, the rotary motor molecule V_1 -ATPase derived from the thermophile, *Thermus thermophilus* is a complex having three peptides of SEQ ID NO:3 corresponding to the A subunit, three peptides of SEQ ID NO:4 corresponding to the B subunit, and one peptide of SEQ ID NO:5 corresponding to the D subunit is one preferred mode.

[0017]

Furthermore, in another mode of the invention, the rotary motor molecule V_1 -ATPase of the present invention is an improved type molecule which has at least one substitution of Ala residue for the 232nd Ser residue and Ser residue for the 235th Thr residue in SEQ ID NO:3.

[0018]

In this improved V_1 -ATPase, the improvement of the A subunit, the catalyst portion, allows dissolution of MgADP inhibition and acceleration of ATP hydrolysis activity. Rotation of a wild type of V_1 -ATPase tends to be suppressed due to MgADP inhibition, and the modified V_1 -ATPase that

prevents MgADP inhibition exhibits efficient rotational motion.

[0019]

Furthermore, a further mode of the present invention is that the rotary motor molecule V_1 -ATPase is an improved molecule in which one or both of the A and B subunits is fixed on a substrate. In this case, a preferred mode is that the molecule is fixed on the substrate via an His tag bound to the N terminal of the A subunit.

[0020]

In a still another mode of the invention, the rotary motor molecule V_1 -ATPase has a joint bound to the D subunit. In this case, the joint material is bound to at least one of Cys residue substituted for the 48th Glu residue and Cys residue substituted for the 55th Gln residue in SEQ ID NO:5, and the case where all the Cys residues in the A and B subunits are replaced by non-Cys residues is another preferred mode.

[0021]

That is, the rotary motor molecule V_1 -ATPase of the present invention comprises the V_1 portion (a complex comprised of three A subunits, three B subunits, one D subunit) of V type (tonoplast type) ATPase (V_0V_1 -ATPase) present in organelles (vacuole, lysosome, Golgi vesicle, cell membrane, coated vesicle, secretory granule, etc) of a bacterium or a eukaryote. Although a V_0V_1 -ATPase synthase has already known to serve as a rotary motor molecule, the V_1 portion (V_1 -ATPase) of this V_0V_1 -ATPase was not known to have rotational motion at all. The V_1 -ATPase of this invention has been completed by for the first time finding that the D subunit located inside a "cylindrical body" comprised of three A subunits and three B subunits a D subunit functions as a rotary shaft.

[0022]

In addition, the V_1 portion of a V_0V_1 -ATPase has one F subunit bound to the D subunit, but the V_1 -ATPase of this invention also includes a molecule that binds this F subunit. Also, examples of V_1 -ATPases of this

invention include not only a wild type, but also a variety of variants as described above. Furthermore, the examples include a variant into which a zinc recognizing portion is incorporated, as disclosed in Non-patent document 10 as noted above.

[0023]

Hereinafter, each invention as described above will be set forth in detail with embodiments of the invention. For the embodiments, a variety of arts used in order to carry out this invention, exclusive of the arts particularly indicating the sources thereof, can be readily and surely carried out by a person skilled in the art in accordance with literatures or the like. For instance, descriptions of genetic engineering and molecular biological technology, such as Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; and Ausubel, F. M. et al., Current John Wiley & Sons, New York, N. Y. Protocols in Molecular Biology, 1995 can be used for reference.

[0024]

[Embodiments for Invention]

The rotary motor molecule V_1 -ATPase of this invention is the V_1 (V_1 -ATPase) portion of V_0V_1 -ATPase produced from various bacteria or eukaryotes. The V_1 -ATPase can be produced by genetic engineering using a polynucleotide (DNA fragment, RNA fragment, or preferably cDNA fragment. Hereinafter, it may be denoted as " V_1 -ATPase polynucleotide") encoding the V_1 -ATPase. Namely, sequences of the polynucleotide (cDNA fragment) encoding the V_0V_1 -ATPase are disclosed in many data bases (e.g., GenBank data base: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and using the sequence information in a probe hybridization process or a PCR process, the polynucleotide (cDNA fragment) encoding the V_0V_1 -ATPase can be readily obtained from existent cDNA libraries, or the like.

[0025]

Expression of this V_1 -ATPase polynucleotide using a well-known

genetic engineering process can provide a complex V_1 -ATPase comprised of three A subunits, three B subunits and one D subunit. For instance, the recombination of a V_1 -ATPase polynucleotide into an expression vector having an RNA polymerase promoter and then addition of this recombinant vector into an in vitro translation system including RNA polymerase corresponding to the promoter, such as rabbit reticulocyte lysate or a wheat embryo extract, can produce the V_1 -ATPase having rotation capability *in vitro*. Examples of the RNA polymerase promoter can include T7, T3, and SP6. Examples of vectors containing these RNA polymerase promoters include pKA1, pCDM8, pT3/T7 18, pT7/3 19, and pBluescript II. Also, the expression of a V_1 -ATPase polynucleotide in a suitable host-vector system can produce the rotary motor molecule V_1 -ATPase in a prokaryotic cell such as *E. coli*., or hay bacillus, a eukaryotic cell such as yeast, an insect cell, a mammal cell, or plant cell, or the like. For example, when the V_1 -ATPase is expressed in a microorganism such as *E. coli*., the polynucleotide is recombined into an expression vector having an origin replicable in the microorganism, a promoter, a ribosome binding portion, a DNA cloning portion, a terminator and the like, to prepare an expression vector which transforms the host cell. Culturing this transformant can produce the target V_1 -ATPase molecules from the culture in quantity. Examples of expression vector for *E. coli* include pUC system, pBluescript II, pET expression system, and pGEX expression system. Furthermore, when the polynucleotide is to be expressed in a eukaryotic cell, the polynucleotide is inserted into an expression vector for a eukaryotic cell, the vector having a promoter, a splicing region, poly(A) addition portion and the like, resulting in a recombinant vector. From eukaryotic cells transfected with this vector can be obtained the target V_1 -ATPase molecules. Examples of the expression vector include pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV vector, pRS, and pYES2. Eukaryotic cells that can be used include mammal culture cells such as

human embryo renal cell line HEK293, monkey renal cell line COS7, Chinese hamster ovarian cell line CHO, or primary culture cells isolated from human organ, and the like. The eukaryotic cells that can be used also include budding yeast, fission yeast, silkworm cells, and *Xenopus* egg cells. For the expression vector to be transfected into eukaryotic cells, a known method such as electroporation, calcium phosphate method, ribosome method, DEAE dextran method, and the like may be used. For isolation and purification of the V_1 -ATPase expressed from the transformant cells, well known separation operations can be carried out in combination. Examples of the isolation and purification include treatment with a modifying agent such as urea or with a surfactant, ultrasonic treatment, enzyme digestion, salting out or the solvent precipitation method, dialysis, centrifugation, ultrafiltration, gel filtration, SDS-PAGE, isoelectric focusing electrophoresis, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, reversed phase chromatography, and the like.

[0026]

Also, the rotary motor molecule V_1 -ATPase of this invention is preferably a heat resisting molecule for the sake of industrial utilization. Hence, preferably, a V_1 -ATPase polynucleotide is derived from a bacterium of *Thermus* genus, *Methanococcus* genus, *Sulfolobus* genus, or the like, which grows at 65°C or more. Further, use of a V_1 -ATPase polynucleotide derived from the thermophile *Thermus thermophilus*, which is capable of growing even at 70°C or more is particularly preferable. The V_1 -ATPase polynucleotide derived from *Thermus thermophilus* has the base sequence of SEQ ID NO:1. The V_1 -ATPase polynucleotide derived from *Thermus thermophilus* encodes a complex of the polypeptide (F subunit) consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, the polypeptide (A subunit) of SEQ ID NO:3, the polypeptide (B subunit) of SEQ ID NO:4, and the polypeptide (D subunit) of SEQ ID NO:5. Therefore, expressing the

334-4196 nt sequence of SEQ ID NO:1 by means of the aforementioned genetic engineering technology can give a heat resisting V_1 -ATPase comprising of three A subunits, three B subunits and one D subunit. In addition, expressing the 1-4196 nt sequence of SEQ ID NO:1 can provide a heat resisting V_1 -ATPase having one F subunit bound to the D subunit thereof.

[0027]

A still another preferred mode of the rotary motor molecule V_1 -ATPase of this invention has substitution of Ala residue for the 232nd Ser residue or substitution of Ser residue for the 235th Thr residue, or both, in SEQ ID NO:3, and a particularly preferred mode is the improved molecule having both substitutions (hereinafter, a molecule having both substitutions may be denoted as a "TSSA variant"). In other words, in contrast to a V -ATPase of a eukaryotic cell, the reaction of the V_1 -ATPase derived from a bacterium such as *T. thermophilus* has a tendency to be interrupted during the metabolic turnover of the catalyst due to the so-called MgADP inhibition (J Biol Chem 273, 20504-20510, 1998). Normally, this ADP restriction appears within 5 minutes after ATP has been added as a substrate, and in about 10 minutes the V_1 -ATPase stops ATP hydrolysis. Thus, the inventors of this application have prepared some variants and studied the ADP restriction effects. As a result, the inventors have found that the aforementioned TSSA variant continues ATP activity even for one hour after the addition of ATP as a substrate.

[0028]

Still another preferred mode of the rotary motor molecule V_1 -ATPase of this invention is a modified molecule where either the A or B subunit or both is fixed on a substrate. The reason is that this fixation makes it possible to efficiently transmit the rotation of the D subunit. Binding of A and/or B subunit like this on a substrate can be carried out by a variety of methods, for example using covalent bonding, but preferably

a method is employed involving bonding His (hectahistidine) tag to the N terminal of A subunit and then bonding this His tag to Ni-NTA slide (Nature 386: 299-302, 1997; FEBS Letters 470: 244-248, 2000).

[0029]

In another preferred mode of the rotary motor molecule V_1 -ATPase of this invention, the D subunit is bound to a joint material. The term "joint material" in this case means a material for transmitting the rotational motion of the D subunit of the V_1 -ATPase to another component (e.g., a gear or a shaft of a motion engine, or the like). Also, this joint material is not for connection to another component, but can also be utilized as a "probe" or a "propeller" for observing the rotation of the V_1 -ATPase. Examples of joint materials that can be utilized include a plurality of previously mentioned beads (microspheres) that are connected as seen in Embodiments described below, and a fine fiber such as actin filament (Nature 386: 299-302, 1997). This joint material can be bonded to Cys residue of the D subunit, for example, by maleimide or disulfide bonding or the like. However, the D subunit of the V_1 -ATPase derived from *Thermus thermophilus*, the amino sequence of which was indicated in SEQ ID NO:5, does not have Cys residues, and thus a suitable non-Cys residue needs to be replaced by Cys residue. For this reason, in this invention, a joint material is preferably bound to Cys residue substituted for the 48th Glu residue or Cys residue substituted for the 55th Gln residue (preferably both) in SEQ ID NO:5. In addition, Cys residues other than those in D subunit (a total of nine Cys residues in A subunit, three Cys residues in B subunit) are preferably replaced by other residues (e.g., Ser residues) so that these Cys residues are not bound to the joint material.

[0030]

Alternatively, a joint material can be made not to bind to D subunit, but to F subunit which binds to D subunit. In this case, for example, the

28th Ser and/or the 35th Ser residue is replaced by Cys residue in the amino acid of SEQ ID NO:2, and to these Cys residues can be bound a joint material.

[0031]

Furthermore, each of the above-described V_1 -ATPases can be obtained by replacing a triplet encoding the specified amino residue in a V_1 -ATPase polynucleotide by means of a method using a mutation kit or the like, the mutagenesis PCR, or a polynucleotide synthesizing method (e.g., Nucleic Acid Res. 25: 3440-3444, 1997), and then expressing this mutated polynucleotide by a genetic engineering process.

[0032]

Hereinafter, the present invention will be described in terms of Examples in more detail and specifically; however, the invention is by no means limited by the Examples below.

[0033]

[Examples]

1. Material and Method

1-1. Preparation of Proteins

The V_1 -ATPase was expressed through the use of E. Coli BL21-CodonPlus-RP (Stragene) transformed with the plasmid pUCV1 that possessing the DNA sequences encoding each of the A, B, D, and F subunits of the V_1 -ATPase derived from *T. thermophilus* HB8 under the control of *lac* promoter. Also, the DNA sequences encoding each of the A, B, D, and F subunits were modified to prepare the following variants (the amino acid positions correspond to SEQ ID NOS:2 to 5).

I: V_1 -ATPase (A-His8-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/D-E48C/D-Q55C)

- (1) Binding a His tag to the N terminal of the A subunit (A-His8-tags)
- (2) Substituting Ser residues for all the Cys residues of the A and B subunits (Δ Cys)
- (3) Substituting Ala for the 232nd Ser of the A subunit (A-S232A)

- (4) Substituting Ser for the 235th Thr of the A subunit (A-T235S)
- (5) Substituting Cys for the 48th Glu of the D subunit (D-E48C)
- (6) Substituting Cys for the 55th Gln of the D subunit (D-Q55C)

II: V₁-ATPase (A-His8-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C)

- (1) Binding a His tag to the N terminal of the A subunit (A-His8-tags)
- (2) Substituting Ser residues for all the Cys residues of the A and B subunits (Δ Cys)
- (3) Substituting Ala for the 232nd Ser of the A subunit (A-S232A)
- (4) Substituting Ser for the 235th Thr of the A subunit (A-T235S)
- (7) Substituting Cys for the 28th Ser of the F subunit (S28C)
- (8) Substituting Cys for the 35th Ser of the F subunit (S35C)

After transformed cells were suspended in 20 mM imidazole/HCl (pH 8.0) containing 0.3 M NaCl, and after the resulting suspension was heated at 65°C for 30 minutes, the proteins unstable under heat were removed, and then the resulting material was placed into a Ni²⁺-affinity column (Amersham) and eluted with 0.5 M imidazole/HCl (pH 8.0) containing 0.3 M NaCl. To the eluate was added a buffer, and this mixture was given ultrafiltration (VIVA-Spin, VIVA science) and was subsequently put into a RESOURCE Q column. The portion containing a V₁-ATPase was placed into Superdex 200 column (Amersham) and there the contamination-relating proteins were removed. The purified V₁-ATPase was subjected to biotinylation with more than two moles of 6-[N'-[2-(N-maleimido)ethyl]-N-piperazinylamido]hexyl D-biotinamide (biotin-PEAC₅-malaimide, Dojindo). The resulting substance was incubated at 25°C for 15 minutes and then the protein was placed into a PD-10 Column (Amersham) where the unreacted reagents were removed. Biotinylation of the D and F subunits was confirmed by the western blotting technique using streptavidin-alkalinephosphatase conjugate (Amersham) (Figure 2).

1-2 Rotation Observation

Flow cell of 5 μ l was fabricated from two cover slips (a spacer with a thickness of 50 nm between them). The bottom glass surface was coated with Ni²⁺-nitrilotriacetic acid, and the biotinylated V₁-ATPase (0.1-1 μ M) contained in the A solution composed of a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) and 0.5% (w/v) BSA was poured into the flow cell, and His tags were bound to the glass, thereby fixing the V₁-ATPase.

[0034]

The flow cell was filled with solution of beads (ϕ = 0.56 μ m, Bangs Laboratories inc.) coated with 0.1% (w/v) Streptavidin, binding some beads to the D or F subunit by biotin-streptavidine bonding. The unbound beads were removed by washing.

[0035]

With the rotation of the V₁-ATPase molecule, the rotation of a bead was in ATP of specified concentration (0.2 mg/ml creatine kinase and 2.5 mM creatine phosphate ATP in the regenerating system) observed under a bright field microscope (IX70, Olympus, magnifying power 1000). Also, the state of rotation was recorded with a CCD camera. This V₁-ATPase rotation observation system is similar to F₁-ATPase rotation system (Proc Natl Acad Sci USA 98, 13649-54, 2001). Specifically, rotation about a slanted bonding, due to the beads being bound to the D or F subunit, was observed (Figure 2).

1-3. Other Assays

The protein concentrations were determined by UV measurement. The ATP hydrolytic activity was determined from the oxidation of NADH which couples pyruvate kinase and lactate dehydrogenase.

2. Results

2-1. Observation of Rotation

The two variants; the V₁-ATPase (A-His8-tags/ Δ Cys/A-S232A/

A-T235S/D-E48C/D-Q55C) and the V_1 -ATPase (A-His8-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C) were observed for the rotation thereof. The two variants showed kinetics that follow the Michaelis Menten equation, with the two variants having K_m of 0.3 to 0.5 mM and V_{max} (turnover rate) of about 10 sec⁻¹. These values are almost the same as those of the wild type F_0F_1 -ATP synthase (J Biol Chem 273, 20504-1014, 1998).

2-2. Rotation of D Subunit

When a buffer containing ATP was poured into flow cell, the rotation of a bead bound to D subunit of the V_1 -ATPase was observed (Figures 3A to 3D). In flow cell, rotations of 5 to 10 beads were observed.

[0036]

The rotation was in one direction, in the case of F_1 -ATPase the rotation always counterclockwise viewed from the cell membrane side. In a buffer not containing ATP, one-direction rotation distinguishable from Brownian motion was not observed.

[0037]

An azide is known to inhibit both ATPase activity and rotation of the F_1 -ATPase (Nature 386, 299-302, 1997), but not to inhibit the ATPase activity of a V_1 -ATPase (J Biol Chem 265, 21946-50, 1990). The rotation of a variant V_1 -ATPase is the same as the above. This is because an azide did not affect the rotation of a V_1 -ATPase in the presence of 4 mM ATP (Figure 3A and 3B) or in the presence of 0.1 mM ATP.

[0038]

The average number of revolutions in the presence of 4 mM ATP was about 2.6 rps (revolutions per sec) or fewer. The average number of revolutions in the presence of 1 mM ATP was about 2.4 rps or fewer. Assuming that one revolution consumes three molecules of ATP, the revolution speed is in good agreement with the ATP hydrolysis speed observed in the bulk enzyme reaction theory (hydrolysis of about 10 ATPs

per sec). Also, at 0.5 mM ATP the average number of revolutions is decreased to about 2.2 rps (Figure 3C).

2-3. Rotation of F Subunit

The rotation of a bead bound to F subunit was observed as well. Under a condition of 4 mM ATP concentration, 1 to 3 rotating beads were observed (Figure 4). The rotation direction was always counterclockwise. The revolution speed was about 2.5 rps, which was almost the same as the revolution speed of the bead on D subunit.

[0039]

[Effects of the Invention]

As described in detail thus far, the invention of this filing provides V_1 -ATPase as a novel rotary motor molecule. In addition, a variety of variant V_1 -ATPases are provided which are more practical forms of this rotary motor molecule V_1 -ATPase. These will greatly contribute to the fabrication of a micromachine, a nanomachine, and the like.

[0040]

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A Rotary Motor molecule V1-ATPase

<130> NP02447-YS

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4199

<212> DNA

<213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (318)

<220>

<221> CDS

<222> (334).. (2067)

<220>

<221> CDS

<222> (2081).. (3514)

<220>

<221> CDS

<222> (3528).. (4196)

<400> 1

gtg	agg	atg	gcg	gtg	atc	gcc	gat	ccc	gag	acc	gcc	cag	ggg	ttc	cgg	48
Val	Arg	Met	Ala	Val	Ile	Ala	Asp	Pro	Glu	Thr	Ala	Gln	Gly	Phe	Arg	
1				5				10					15			

ctc	gcg	ggc	ctc	gag	ggc	tac	ggg	gcc	tct	tcg	gcg	gag	gag	gcc	caa	96
Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Gly	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Ala	Glu	Glu	Ala	Gln	
			20				25					30				

agc ctc ctg gaa acc ctc gtg gag cgg ggc ggc tac gcc ctg gtg gcc	144
Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala	
35 40 45	
gtg gac gag gcg ctc ctc ccc gac ccc gag cgg gcg gtg gag cgc ctc	192
Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu	
50 55 60	
atg cgg ggc agg gac ctc ccc gtg ctc ctg ccc atc gcg ggg ctg aag	240
Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys	
65 70 75 80	
gag gcc ttc cag ggg cac gac gtg gaa ggc tac atg cgg gag ctg gtg	288
Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val	
85 90 95	
agg aag acc atc ggc ttt gac atc aag ctg tagaatggag ggacg atg atc	339
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu Met Ile	
100 105	
caa ggg gtg atc cag aag atc gcg ggc ccg gcg gtg atc gcc aag ggc	387
Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala Lys Gly	
110 115 120	
atg ctc ggg gcc cgc atg tac gac atc tgc aag gtg ggc gaa gag ggc	435
Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu Glu Gly	
125 130 135 140	
ctc gtg ggc gag atc atc cgc ctg gac ggg gac acg gcc ttc gtc cag	483
Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe Val Gln	
145 150 155	
gtc tac gag gac acc tcg ggc cta aag gtg ggg gag ccc gtg gtc tcc	531
Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val Val Ser	
160 165 170	
acg ggg ctt ccc ttg gcg gtg gag ctc ggc ccc ggg atg ctg aac ggc	579
Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu Asn Gly	
175 180 185	
atc tac gac ggc atc cag cgc ccc ctg gag cgc atc cgg gag aag acg	627
Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu Lys Thr	
190 195 200	
ggg atc tac atc acc cgg ggc gtg gtg gtc cac gcc ctg gac cgg gag	675

Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp Arg Glu	
205	210 215 220
aag aag tgg gcc tgg acg ccc atg gtc aag ccc ggg gac gag gtg cgg	723
Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Arg	
	225 230 235
ggg ggt atg gtc ctg ggc acg gtg ccc gag ttc ggc ttc acc cac aag	771
Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr His Lys	
	240 245 250
atc ctg gta ccc ccg gac gtg cgg ggc cgg gtc aag gag gtg aag ccc	819
Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val Lys Pro	
	255 260 265
gcc ggg gag tac acc gtg gag gag ccg gtg gtg gtc ctc gag gac ggc	867
Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu Asp Gly	
	270 275 280
acc gag ctc aag atg tac cac acc tgg ccc gtt cgc cgg gcg agg ccc	915
Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala Arg Pro	
	285 290 295 300
gtg caa agg aag ctt gac ccc aac acc ccc ttc ctc acg ggg atg cgc	963
Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly Met Arg	
	305 310 315
atc ctg gac gtc ctc ttc ccc gtg gcc atg ggg ggc acc gcc gcc atc	1011
Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala Ala Ile	
	320 325 330
cct ggg ccc ttc ggc agc ggc aag acc gtg acc cag cag tcc ctg gcc	1059
Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser Leu Ala	
	335 340 345
aag tgg tcc aac gcc gac gtg gtg gtc tac gtg ggc tgc ggg gag cgg	1107
Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly Glu Arg	
	350 355 360
ggg aac gag atg acc gac gtg ctc gtg gag ttc ccc gag ctc acc gac	1155
Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu Thr Asp	
	365 370 375 380
ccc aag acg ggg ggg ccc ttg atg cac cgc acc gtc ctc atc gcc aac	1203
Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile Ala Asn	

385	390	395	
acc tcc aac atg ccc gtg gcc gcc cgc gag gcc agc atc tac gtg ggc			1251
Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr Val Gly			
400	405	410	
gtg acc atc gcc gag tac ttc cgc gac cag ggc ttc tcc gtg gcc ctc			1299
Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val Ala Leu			
415	420	425	
atg gcc gac tcc acg agc cgc tgg gcc gag gct ttg cgc gag atc tct			1347
Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu Ile Ser			
430	435	440	
agc cgc ctc gag gag atg ccc gcc gag gag ggc tac ccg ccc tac ctc			1395
Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro Tyr Leu			
445	450	455	460
gcc gcc agg ctc gcc gcc ttc tac gag cgg gcg ggc aag gtc atc acc			1443
Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val Ile Thr			
465	470	475	
ctg ggc ggc gag gag ggg gcg gtg acc atc gtg ggg gcc gtc tcc ccg			1491
Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val Ser Pro			
480	485	490	
ccg ggc ggc gac atg tcc gag ccc gtg acc cag tcc acc ttg agg atc			1539
Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu Arg Ile			
495	500	505	
gtg ggg gcc ttc tgg cgg ctt gac gcc tcc ctg gcc ttc cgc cgc cac			1587
Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg Arg His			
510	515	520	
ttc ccc gcc atc aac tgg aac ggc tcc tac agc ctc ttc acc tcc gcc			1635
Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Ser Ala			
525	530	535	540
ctt gac ccc tgg tac cgg gag aac gtg gcc gag gac tac ccc gag ctc			1683
Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro Glu Leu			
545	550	555	
cgc gac gcc atc tcc gag ctt ttg cag cgg gag gcg ggc ctc cag gag			1731
Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu Gln Glu			
560	565	570	

atc gtc cag ctc gtg ggg ccg gac gcc ctc cag gac gcc gag cgc ctc Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu Arg Leu 575 580 585	1779
gtc att gag gtg ggc cgg atc atc cgc gag gac ttc ctg cag cag aac Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln Gln Asn 590 595 600	1827
gcc tac cac gag gtg gac gcc tac tgc tcc atg aag aag gcc tac ggg Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala Tyr Gly 605 610 615 620	1875
atc atg aag atg atc ctc gcc ttc tac aag gag gcg gag gcg gcc atc Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala Ala Ile 625 630 635	1923
aag cgg ggg gtt tcc ata gac gag atc ctg cag ctc ccc gtt ctg gag Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu 640 645 650	1971
cgc atc ggc cgc gcc cgc tac gtg agc gag gag gag ttc ccc gcc tac Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro Ala Tyr 655 660 665	2019
ttt gag gag gcc atg aag gag atc cag ggg gcc ttc aag gcc ctg gcc Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala Leu Ala 670 675 680	2067
taaaggggga gag atg gac ctt ctg aag aag gag tac acg ggc atc acc Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr 685 690 695	2116
tac atc tcg ggg cct ctt ctc ttc gtg gag aac gcc aag gac ctg gcc Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala 700 705 710	2164
tac ggg gcc atc gtg gac atc aag gac ggc acg ggc cgg gtc cgc ggc Tyr Gly Ala Ile Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly 715 720 725	2212
ggc cag gtg att gag gtc tcc gag gag tac gcc gtc atc cag gtg ttt Gly Gln Val Ile Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe 730 735 740	2260

Certificate No. 2004-3025902

Met Ala Leu Thr Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His	
925 930 935	
gtc ctc gtc atc ctc acg gac atg acc aac tac tgc gag gcc ttg cgg	2884
Val Leu Val Ile Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg	
940 945 950	
gag atc ggg gcc gcc cgc gag gag atc ccg ggc cgc cgc ggt tac ccc	2932
Glu Ile Gly Ala Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro	
955 960 965	
ggc tac atg tac acc gac ctg gcc acc atc tac gag cgc gcc ggg gtg	2980
Gly Tyr Met Tyr Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val	
970 975 980	
gtg gag ggg aag aag ggg agc gtg acc cag atc ccc atc ctc tcc atg	3028
Val Glu Gly Lys Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met	
985 990 995 1000	
ccc gac gac gac cgc acc cac ccc atc ccc gac ctc acg ggc tac atc	3076
Pro Asp Asp Asp Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile	
1005 1010 1015	
acc gag ggg cag atc cag ctc tcc cgg gag ctc cac cgc aag ggc atc	3124
Thr Glu Gly Gln Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile	
1020 1025 1030	
tac ccg ccc att gac ccc ttg ccc tcc ctc tcc cgg ctc atg aac aac	3172
Tyr Pro Pro Ile Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn	
1035 1040 1045	
ggc gtg ggc aag ggc aag acc cgg gag gac cac aag cag gtc tcc gac	3220
Gly Val Gly Lys Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp	
1050 1055 1060	
cag ctc tac tcc gcc tac gcc aac ggg gtg gac atc cgg aag ctc gtg	3268
Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val	
1065 1070 1075 1080	
gcc atc atc ggc gag gac gcc ctc acg gag aac gac cgc cgt tac ctc	3316
Ala Ile Ile Gly Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu	
1085 1090 1095	
cag ttc gcc gac gcc ttt gaa cgg ttc ttc atc aac cag ggg cag cag	3364
Gln Phe Ala Asp Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln	

1100	1105	1110	
aac cgc tcc att gag gag agc ctg cag atc gcc tgg gcc ctc ctc tcc			3412
Asn Arg Ser Ile Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser			
1115	1120	1125	
atg ctg ccc cag ggc gag ctc aag cgc atc tcc aag gac cac atc ggc			3460
Met Leu Pro Gln Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly			
1130	1135	1140	
aag tac tac ggc cag aag ctg gag gag atc tgg ggc gcg ccc cag gcc			3508
Lys Tyr Tyr Gly Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala			
1145	1150	1155	1160
ctg gac taagggaggg tag atg agc cag gtg agc ccc acc cgg atg aac			3557
Leu Asp	Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn		
	1165	1170	
ctt ctg cag agg cgg ggg cag ctc cgc ctg gcg cag aag ggg gtg gac			3605
Leu Leu Gln Arg Arg Gly Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp			
1175	1180	1185	
ctc ctc aag aag aag cgg gac gcc ctg gtg gcc gag ttc ttc ggc ctg			3653
Leu Leu Lys Lys Lys Arg Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu			
1190	1195	1200	
gtg cgg gag gcc atg gag gcc agg aag gcc ctg gac cag gcg gcc aag			3701
Val Arg Glu Ala Met Glu Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys			
1205	1210	1215	1220
gag gcc tac gcc gcc ctc ctc ctg gcc cag gcc ttt gac ggg ccg gag			3749
Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu			
1225	1230	1235	
gtg gtg gcg ggg gcg gcc ctt ggg gtc ccg ccc ctc gag ggg gtg gag			3797
Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu			
1240	1245	1250	
gcg gag gtg gag aac gtc tgg ggg agc aag gtg ccg agg ctc aag gcc			3845
Ala Glu Val Glu Asn Val Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala			
1255	1260	1265	
acc ttc ccc gac ggg gcc ctc ctt tcc ccg gtg ggg acc ccg gcc tac			3893
Thr Phe Pro Asp Gly Ala Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr			
1270	1275	1280	

acc ctc gag gcc agc cgg gcc ttc cgc cgc tac gcc gag gcc ctg atc 3941
 Thr Leu Glu Ala Ser Arg Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile
 1285 1290 1295 1300

 cgg gtg gcc aac acc gag acc cgc ctg aag aag atc ggg gag gag atc 3989
 Arg Val Ala Asn Thr Glu Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile
 1305 1310 1315

 aag aag acc acg cgg cgg gtg aac gcc ctg gag cag gtg gtg atc ccg 4037
 Lys Lys Thr Thr Arg Arg Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro
 1320 1325 1330

 ggg atc cgc gcc cag atc cgc ttc atc cag cag gtc ctg gag cag cgg 4085
 Gly Ile Arg Ala Gln Ile Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg
 1335 1340 1345

 gaa cgg gag gac acc ttc cgc ctc aag cgc atc aag ggc aag att gag 4133
 Glu Arg Glu Asp Thr Phe Arg Leu Lys Arg Ile Lys Gly Lys Ile Glu
 1350 1355 1360

 gcc cgg gag gcc gag gag gag ggc ggc cgg ccc aac ccg cag gtg gag 4181
 Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Gly Gly Arg Pro Asn Pro Gln Val Glu
 1365 1370 1375 1380

 atc ggg gcg ggc ctt taa 4199
 Ile Gly Ala Gly Leu
 1385

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 2

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln
 20 25 30
 Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala
 35 40 45
 Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu
 50 55 60
 Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys

65	70	75	80
Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val			
	85	90	95
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu			
100	105		

<210> 3

<211> 578

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 3

Met Ile Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala			
1	5	10	15
Lys Gly Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu			
	20	25	30
Glu Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe			
	35	40	45
Val Gln Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val			
	50	55	60
Val Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu			
	65	70	75
Asn Gly Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu			
	85	90	95
Lys Thr Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp			
	100	105	110
Arg Glu Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu			
	115	120	125
Val Arg Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr			
	130	135	140
His Lys Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val			
	145	150	155
Lys Pro Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu			
	165	170	175
Asp Gly Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala			
	180	185	190
Arg Pro Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly			
	195	200	205
Met Arg Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala			
	210	215	220
Ala Ile Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser			
	225	230	235
Leu Ala Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly			
	245	250	255

Glu Arg Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu
 260 265 270
 Thr Asp Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile
 275 280 285
 Ala Asn Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr
 290 295 300
 Val Gly Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val
 305 310 315 320
 Ala Leu Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Ile Ser Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val
 355 360 365
 Ile Thr Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val
 370 375 380
 Ser Pro Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu
 385 390 395 400
 Arg Ile Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg
 405 410 415
 Arg His Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr
 420 425 430
 Ser Ala Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro
 435 440 445
 Glu Leu Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu
 450 455 460
 Gln Glu Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu
 465 470 475 480
 Arg Leu Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln
 485 490 495
 Gln Asn Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala
 500 505 510
 Tyr Gly Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala
 515 520 525
 Ala Ile Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val
 530 535 540
 Leu Glu Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro
 545 550 555 560
 Ala Tyr Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala
 565 570 575
 Leu Ala

<210> 4

<211> 478

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 4

```

Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr Tyr Ile Ser Gly
 1           5           10           15
Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala Tyr Gly Ala Ile
      20           25           30
Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly Gly Gln Val Ile
      35           40           45
Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe Glu Glu Thr Thr
      50           55           60
Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val Glu Asp Val Ala
      65           70           75           80
Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg Phe Asn Gly Ile
      85           90           95
Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro Glu Lys Arg Leu
      100          105          110
Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg Arg Lys Pro Glu
      115          120          125
Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val Met Asn Thr Leu
      130          135          140
Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser Gly Leu Pro Ala
      145          150          155          160
Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr Val Arg Pro Asp
      165          170          175
Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala Val Val Phe Ala
      180          185          190
Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe Ile Gln Glu Phe
      195          200          205
Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe Leu Asn Lys Ala
      210          215          220
Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg Met Ala Leu Thr
      225          230          235          240
Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His Val Leu Val Ile
      245          250          255
Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ala
      260          265          270
Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro Gly Tyr Met Tyr
      275          280          285
Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val Val Glu Gly Lys
      290          295          300
Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met Pro Asp Asp Asp
      305          310          315          320
Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly Gln

```

```

          325          330          335
Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Pro Ile
          340          345          350
Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn Gly Val Gly Lys
          355          360          365
Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp Gln Leu Tyr Ser
          370          375          380
Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val Ala Ile Ile Gly
385          390          395          400
Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu Gln Phe Ala Asp
          405          410          415
Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln Asn Arg Ser Ile
          420          425          430
Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser Met Leu Pro Gln
          435          440          445
Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly Lys Tyr Tyr Gly
          450          455          460
Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala Leu Asp
465          470          475

```

<210> 5

<211> 223

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 5

```

Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn Leu Leu Gln Arg Arg Gly
 1          5          10          15
Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp Leu Leu Lys Lys Lys Arg
          20          25          30
Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu Val Arg Glu Ala Met Glu
          35          40          45
Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Leu
          50          55          60
Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu Val Val Ala Gly Ala Ala
          65          70          75          80
Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu Ala Glu Val Glu Asn Val
          85          90          95
Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala Thr Phe Pro Asp Gly Ala
          100          105          110
Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr Thr Leu Glu Ala Ser Arg
          115          120          125
Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile Arg Val Ala Asn Thr Glu
          130          135          140

```

Thr	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Gly	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Thr	Arg	Arg
145					150					155					160
Val	Asn	Ala	Leu	Glu	Gln	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Ile	Arg	Ala	Gln	Ile
				165					170					175	
Arg	Phe	Ile	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Gln	Arg	Glu	Arg	Glu	Asp	Thr	Phe
			180					185					190		
Arg	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu
		195					200					205			
Glu	Gly	Gly	Arg	Pro	Asn	Pro	Gln	Val	Glu	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	
	210					215					220				

[Brief Description of Drawings]

[Figure 1]

A schematic diagram indicating the observed rotation of V₁-ATPase. The arrow indicates the direction of rotation.

[Figure 2]

The result of western blotting analysis that has confirmed the biotinylation of a D or an F subunit. The left side (lanes 1 to 4) is obtained by CBB staining and the right side (lanes 5 to 8) is obtained by alkaline phosphatase-streptavidine conjugate staining. Lanes 1 and 5 indicate V₁-ATPase in which the D subunit was biotinylated, lanes 2 and 6 indicate V₁-ATPase with a biotinylated F subunit, lanes 3 and 7 indicate un-biotinylated V₁-ATPase, and lanes 4 and 8 indicate molecular-weight markers.

[Figure 3]

The measurements of rotation of the beads fixed on D subunits over time. "A" shows the rotation of bead in the presence of 4 mM ATP and 0.5 mM sodium azide. "B" to "D" show the results of rotations of beads in the absence of sodium azide, where "B" is 4 mM ATP solution, "C" is 0.5 mM ATP solution, and "D" is 0.2 mM ATP solution.

[Figure 4]

The measurements of rotation of bead fixed on an F subunit in 4mM ATP solution.

[Document] Abstract

[Abstract]

[Problem] To provide a novel rotary motor molecule that is different in properties from the conventional rotary motor molecules.

[Means] A rotary motor molecule V_1 -ATPase rotating in the presence of ATP, which is a complex molecule having three A subunits, three B subunits and one D subunit constituting the V_1 portion of a V_0V_1 -ATPase.

[Selective drawing] Figure 1

Fig.1

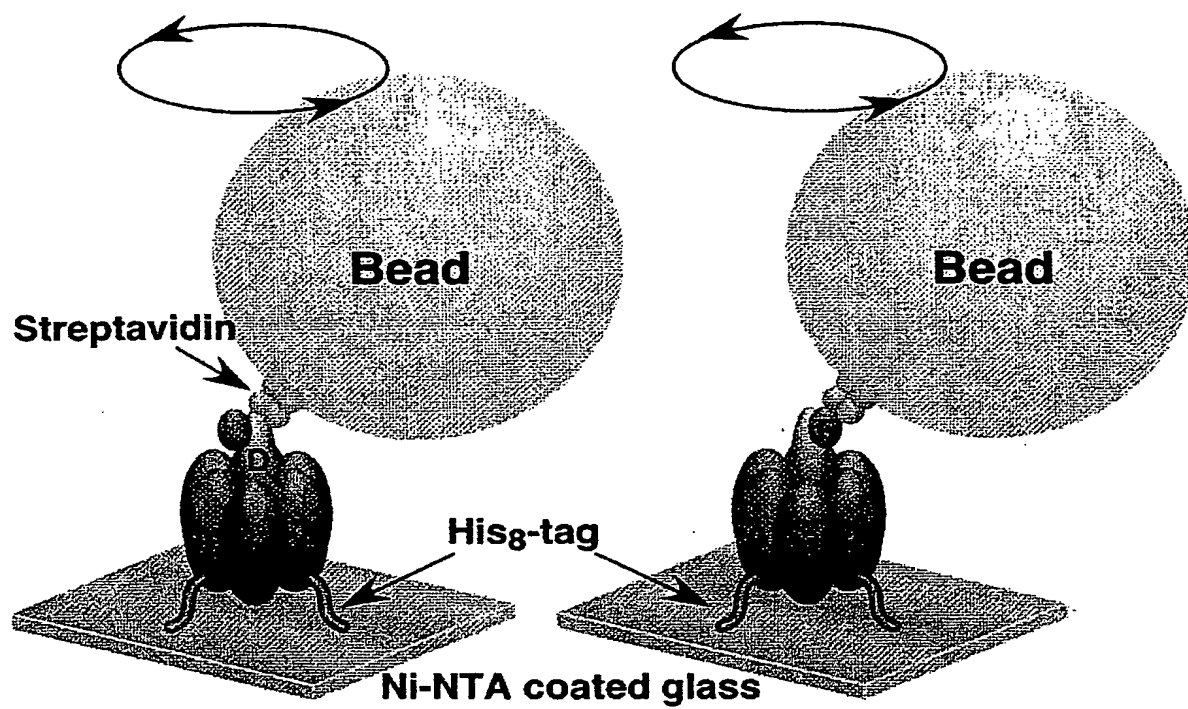


Fig.2

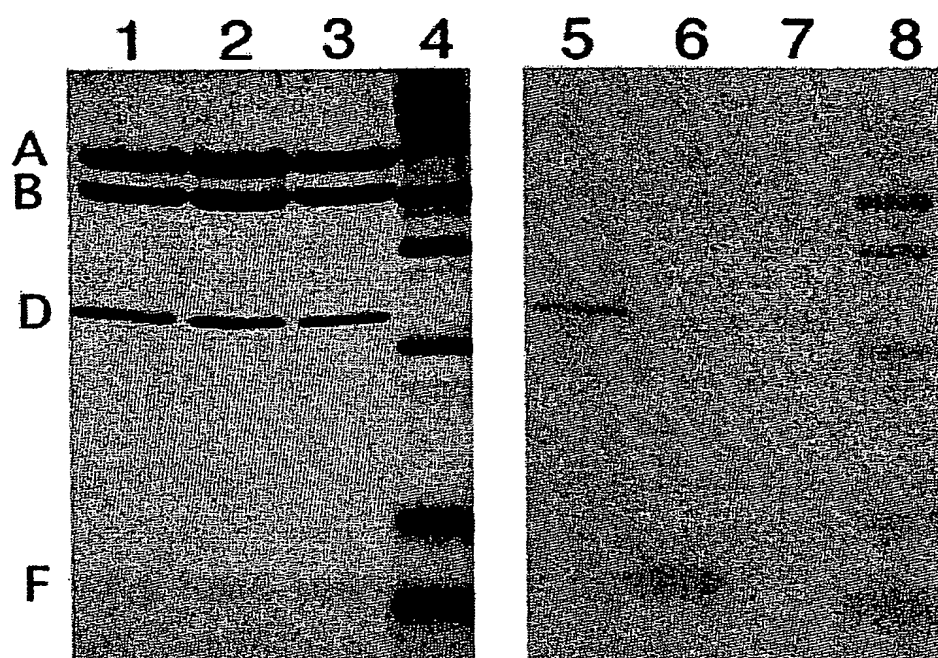


Fig.3

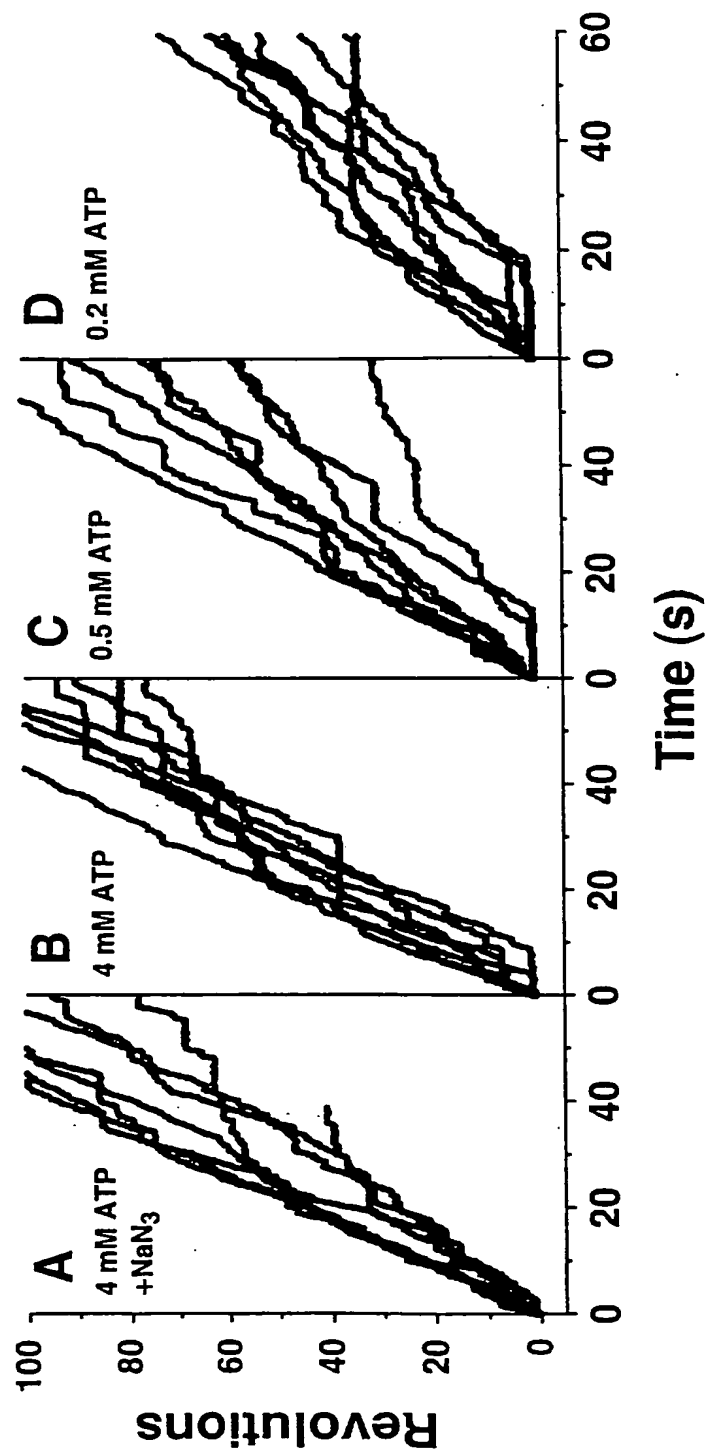


Fig.4

